

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



“Regulación de la expresión de tirosina hidroxilasa por
transcritos quimera y función de la dopamina en la
cardiogénesis”

Memoria presentada por **Óscar Bártulos Encinas** para optar al
grado de Doctor en Biología por la Universidad Autónoma de
Madrid.

Vº Bº de la Directora de Tesis,
Catalina Hernández Sánchez

Vº Bº del Tutor,
José Manuel Cuezva Marcos

Óscar Bártulos Encinas

Madrid, Marzo de 2009

A mis padres, hermanos y sobrino

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Flora de Pablo la confianza depositada en mí, cinco años atrás, para hacer la Tesis Doctoral en su laboratorio, y a la Dra. Catalina Hernández por su labor de dirección y guía.

A los antiguos miembros del laboratorio; Tere, Gaizka, Alicia. Gaizka, fuiste mi salvación en este sitio rodeado de mujeres. A Alicia y Tere de las que aprendí mucho, y me hicieron sentar a recapacitar en no pocas ocasiones (no es fácil). A Silvia, Bea, Eva, Héctor, Rosa, Mario, el Dr. Carlos Vicario, la Dra. Ana Valenciano, porque a pesar de ser tan distintos, de todos he aprendido algo (espero que lo mejor).

A los Drs. Enrique de la Rosa, Teresa Suárez y Patricia Boya, por vuestras críticas constructivas en los seminarios, y los conocimientos adquiridos. A Tany, por las curradas que te has pegado para mantener los cimientos de nuestro subgrupo. A Kike y Patri V, que tienen una paciencia infinita conmigo. A Jimena por las risas y hurtos mutuos. A Ana R, porque te tiende una mano siempre que lo necesitas. A Ane y María, que soportan casi a diario mis bromas. A Ana A, Marian, Natalia, Sergio, Marta, Carol, Violeta y Reda, por los buenos momentos que hemos pasado en y fuera del laboratorio.

A “Producciones 107”, la amistad más allá de la ciencia; Asier, Rodrigo y Carlos que junto con Dey y Kike “soportan” a diario mis payasadas (bueno, las sufrimos mutuamente). Estoy seguro que nuestro futuro no está detrás de las cámaras y que algún día viviremos de la ciencia (no sé como, pero lo haremos).

A las personas con las que he compartido tertulias y debates en torno a la barra de un bar, o de varios y excursiones extraescolares de alto riesgo; Blas, Juan, Gonzalo, Raquel (Kike), Fer (Marian), Alicia (Asier), Luque, Mikel, Úrsula, Eva, Carmen (Cajal), Anakris, Lu, Isa.

A la gente de los servicios del CIB, porque hacéis que las tareas cotidianas sean mucho más fáciles. A Isabel, Manolo y Paco del animalario (aunque no os lo creáis en mi Tesis también he tocado ratones). A las chicas de esterilización, compras, los chicos de mantenimiento, los porteros, los de seguridad, informática, almacén... A las chicas de la limpieza, y en especial a las que son “nuestras chicas de la limpieza”, Aurora y Gisela. A la gente de comedor/cafetería, y en particular a Pilar y a Marcos, por saber darnos el trato especial que todo becario se merece.

A Manolo y a Rocío por acogerme durante el primer año de “incertidumbre” de mi Tesis. A Victor y a Ana, la conexión entre el mundo civilizado (mi pueblo) y la ciudad deshumanizada (Madrid).

A mis dos familias de adopción en Madrid: César, Javi, Ahmad, Rebeca y David (me costó un año pero creo que ya sabes la diferencia entre un ratón y una rata) por un lado y Ricardo, Fuche, Pablo por el otro, habéis sido el punto de desconexión en este loco mundo de la ciencia.

A la Dra. Carmen López y al Dr. Virginio García de la Universidad de Extremadura, por abrirme las puertas de su laboratorio en varias ocasiones a lo largo de mi Tesis. Sin vuestra ayuda gran parte de esta Tesis no se hubiese podido llevar a cabo. Gracias a Paloma por su apoyo logístico, su paciencia y comprensión. A Carlos (*full time*), por su ayuda y las conversaciones hablando de “la otra ciencia”. A Nati y a Mamen con las que empezaron las conversaciones de “la otra ciencia” antes de que Carlos llegase al laboratorio. Gracias a Ricardo, que en no pocas ocasiones sufrió nuestros horarios laborales.

A la Dra. Amelia Aránega, de la Universidad de Jaén, que me permitió conocer y trabajar en su laboratorio durante un mes, y a la gente de su laboratorio, Estefanía, Paco (entre político y cómico), Ana, Débora, Mapi y Ángel.

A los Drs. Deborah Henderson y Bill Chaudhry de la Universidad de Newcastle por la atención prestada durante mi estancia y por dejar a mi libre disposición el material de su laboratorio. También quiero agradecer el apoyo logístico de Kirsty, Tom y Dom, que facilitaron gran parte de mi trabajo. El cansancio permanente que sufrí en Newcastle, que incluso llegué a pensar que podría tratarse de alguna enfermedad, se lo debo a aquellas personas que como Ferrán, María, Ana, Marina, Sebastian, Bianca, Janina, Silvia, Alba y Juanma (nótese que hay alemanes, así que inglés practiqué), me “obligaban” a hacer jornadas próximas a las 24 horas. Gracias a vosotros se hizo más llevadero. Gracias a la gente de Newcastle, con la que intenté (en vano) practicar una fonética que para la gente del “olé”, “toros” y “sevillanas” nos es desconocida.

A la Dra. Aixa Morales del Instituto Cajal, que al igual que varias almas caritativas también me cedió espacio, material y conocimientos en su laboratorio, aunque no se vea reflejado en esta Tesis.

Gracias a todos y todas, de corazón.

aa: aminoácido.

AADC: aminoácido aromático descarboxilasa.

AMHC-1: del inglés *Auricular Myosin Heavy Chain 1*.

α -MHC: del inglés *alpha Myosin Heavy Chain*.

AMPc: adenosinmonofosfato cíclico.

AMPT: alfa metilparatirosina.

AR: ácido retinóico.

BCIP: del inglés *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*.

β -Globin: globina β adulta.

β H1: globina β embrionaria.

BMP: del inglés *Bone Morphogenetic Protein*.

BSA: del inglés *Bovine Serum Albumin*.

CCP: campo cardíaco primario.

CCS: campo cardíaco secundario.

CD31: del inglés *Cluster of Differentiation 31*. También llamado PECAM-1.

CD34: del inglés *Cluster of Differentiation 34*.

cDNA: del inglés *complementary Deoxyribonucleic Acid*.

CE: cuerpo embrionario.

cols: colaboradores.

COMT: catecoloximetiltransferasa.

CT: célula troncal

cTH: del inglés *chicken Tyrosine Hydroxylase*.

Cx: conexina.

DAB: 3-3'diaminobenzidina.

DABCO: 1,4 diazabicilo (2,2,2) octano.

DAPI: 1,4-diamino-2-fenilindol.

D β H: dopamina β -hidroxilasa.

dCTP: del inglés *2'-deoxycytidine 5'-triphosphate*.

DHBA: 3,4-dihidroxibenzilamina.

DMEM: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

DNA: del inglés *Deoxyribonucleic Acid*.

dNTP: del inglés *deoxynucleotide triphosphate*.

DEPC: dietilpirocarbonato.

DPBS: del inglés *Dulbecco Phosphate Buffered Saline*.

DRB: 5,6-dicloro-1 β -D-ribofuranosilbenzimidazol.

DTT: ditioneitol.

E: día embrionario.

EC: del inglés *Early Chick culture*.

EDTA: etilendiaminotetraacético.

ErbB: *Epidermal growth factor receptor*.

ERK: del inglés *Extracellular signal- Regulated Kinase*.

FBS: del inglés *Fetal Bovine Serum*.

FCS: del inglés *Fetal Calf Serum*.

Fig: figura.

FITC: del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*.

FGF: del inglés *Fibroblast Growth Factor*.

Flk1: VEGF2R, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*.

g: gramo.

GAPDH: del inglés *Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase*.

GFP: del inglés *Green Fluorescent Protein*.

HEK293T: del inglés *Human Endothelial Kidney with SV40 large T antigen*.

Hfr: del inglés *Heart forming region*.

HNK 1: del inglés *Human Natural Killer 1*.

HPLC: del inglés *High Performance Liquid Chromatography*.

HS: del inglés *Horse Serum*.

hpf: del inglés *hours post fertilization*.

ICA: del inglés *Intrinsic Cardiac Adrenergic*.

IRES: del inglés *Internal Ribosome Entry Site*.

Irx: del inglés *Iriquois*.

Isl1: del inglés *Islet1*.

JNK: del inglés *Jun N-terminal Kinase*.

kb: kilobase

l: litro.

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina.

LIF: del inglés *Leukaemia Inhibitory Factor*.

MAO: monoaminooxidasa.

MEF2C: del inglés *Myocyte Enhacer Factor 2C*.

mg: miligramo.

mHBH: meta-hidroxibenzilhidrazina.

ml: mililitro.

mm: milímetro.

mM: milimolar.

mRNA: del inglés *messenger Ribonucleic Acid*.

mTH: del inglés *mouse Tyrosine Hydroxylase*.

mV: milivoltio.

NBT: del inglés *Nitro Blue Tetrazolium*.

Neo: neomicina.

NF: estadios embrionarios de *Xenopus* de Nieuwkoop y Faber.

ng: nanogramo.

NGS: del inglés *Normal Goat Serum*.

NIH3T3: del inglés *National Institutes of Health 3T3*

Nkx: *Nk2 transcription factor*.

Nppa: del inglés *Natriuretic peptide precursor A*.

NRG1: neuregulina 1.

OA1: del inglés *Ocular Albinism type 1*.

pb: pares de bases.

PBS: del inglés *Phosphate Buffered Saline*.

PBT: PBS-Tween.

PBTx: PBS-Tritón.

PCR: del inglés *Polymerase Chain Reaction*.

PFA: paraformaldehído.

PNMT: del inglés *Phenyletanolamine-N-methyltransferase*.

PKC: proteína kinasa C.

p/v: peso/volumen.

qPCR: del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*.

qTH: del inglés *quail Tyrosine Hydroxylase*.

RALDH: del inglés *Retinoic Acid Dehydrogenase*.

RNA: del inglés *Ribonucleic Acid*.

rRNA: del inglés *ribosomal Ribonucleic Acid*.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

RT: del inglés *Reverse Transcription*.

RXR: del inglés *Retinoid-X-Receptor*.

SCL: del inglés *Stem Cell Leukaemia*.
 SDS: del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*.
 SHO: Síndrome Holt-Oram.
 St: del inglés *Stage*.
 TAE: Tris-Acetato-EDTA.
 TBE: Tris-Borato-EDTA.
 Tbx: del inglés *TATA-box protein*.
 TE: Tris-EDTA.
 TGFβ: del inglés *Transforming Growth Factor β*.
 TH: Tirosina Hidroxilasa
 TH-INS: transcrito quimera de tirosina hidroxilasa e insulina.
 tRNA: del inglés *transfer Ribonucleic Acid*.
 TT2: troponina T2.
 U: unidades.
 V: voltio.
 VMHC-1: del inglés *Ventricular Myosin Heavy Chain 1*.
 v/v: volumen/volumen.
 xTH: del inglés *Xenopus Tyrosine Hydroxylase*.
 3-I-Tyr: del inglés *3-Iodo-Tyrosine*.
 μCi: *microcurie*.
 μl: microlitro.
 μg: microgramo.
 μm: micrómetro.
 μM: micromolar.

In all science, error precedes the truth,
and is better it should go first than last.

Hugh Walpole.

Science is organized knowledge.

Wisdom is organized life.

Immanuel Kant.

ÍNDICE

	Página
SUMMARY.	1
I.-INTRODUCCIÓN.	3
1.-La tirosina hidroxilasa: inicio de la síntesis de catecolaminas	6
2.-La tirosina hidroxilasa: la proteína y el gen.	7
3.-Receptores para catecolaminas.	9
4.-Presencia y función de las catecolaminas.	10
4.1.-En el organismo adulto.	10
4.2.-En el desarrollo embrionario.	11
4.2.1.-En el desarrollo embrionario del corazón.	12
5.-El corazón adulto en distintas especies.	12
6.-Formación del corazón embrionario.	14
6.1.-Formación del asa cardíaca.	14
6.2.-Los campos cardíacos primario y secundario.	16
6.3.-El sistema de conducción cardíaco.	18
7.-Señales que actúan positiva y negativamente en el desarrollo embrionario del corazón.	19
7.1.-BMP.	20
7.2.-FGF.	20
7.3.-Wnt.	21
7.4.-Ácido retinóico.	21
7.5.-Neuregulina1.	21
8.-Factores de transcripción implicados en el desarrollo embrionario del corazón.	22
8.1.-Familia Nkx2.X.	22
8.2.-Familia GATA.	23
8.3.-Familia Tbx.	24
8.4.-Familia Irx.	26
II.-OBJETIVOS.	29
III.-MATERIALES Y MÉTODOS.	33
1.-Animales de experimentación.	35
2.-Cultivo <i>EC</i> para embriones de pollo.	35
3.-Implantación de microesferas acrílicas de heparina.	37
4.-Electroporación.	37

5.-Cultivo de líneas celulares inmortalizadas.	39
6.-Transfecciones celulares.	39
7.-Cultivo de células troncales de ratón: línea celular E14.	40
8.-Diferenciación de las células troncales a cardiomiocitos.	41
8.1.- Disposición de las células en “gotas colgantes”.	41
8.2.-Recolección de cuerpos embrionarios (CE).	41
8.3.-Siembra de CE en superficie adherente.	42
9.-Tratamiento de las células E14 con L-DOPA y dopamina.	43
10.-Extracción de RNA.	44
11.-RT.	44
12.-PCR.	44
12.1.-PCR a tiempo final.	44
12.2.-PCR cuantitativa (qPCR).	45
12.2.1.-Utilización del sistema Oligo LUX™.	45
12.2.2.-Utilización del sistema <i>Universal probe</i> .	46
13.- Estabilidad del mRNA.	47
14.- Experimento de pulso-caza e inmunoprecipitación.	48
15.-Generación de sondas.	48
15.1.-cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2 en pCIneo.	48
15.2.-cTH y cTH-INS1 con epítipo V5.	49
15.3.-Tbx5 en pCR® II TOPO®.	49
15.4.-cTH en pCAGGS y pCAGGS-STOP-IRES-GFP.	49
15.5.-mTH en pCR® II TOPO®.	49
15.6.-Sonda de cDNA de cTH.	49
15.7.-Sonda de DNA genómico de cTH.	50
15.8.-Sonda de Neo.	50
15.9.-Sonda de DNA genómico de mTH.	50
15.10.-Sondas de VMHC-1, AMHC-1 y Nkx2.5.	50
16.- <i>Southern Blot</i> .	50
17.- <i>Northern Blot</i> .	51
18.- Extracción protéica y <i>Western Blot</i> .	52
19.- Medida de catecolaminas por HPLC.	53
20.-Inclusión y secciones en parafina.	54
21.-Hibridación <i>in situ</i> .	54

21.1.-Síntesis de ribosondas.	54
21.2.-Hibridación y revelado.	55
22.-Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.	57
22.1.-Inmunohistoquímica en embrión completo de pollo.	57
22.2.-Inmunohistoquímica en secciones.	57
22.3.-Inmunohistoquímica tras hibridación <i>in situ</i> .	58
22.4.-Inmunofluorescencia en secciones de embrión de pollo.	58
22.5.-Inmunofluorescencia en cuerpos embrionarios.	59
23.-Tinción con hematoxilina-eosina.	59
24.-Análisis estadístico de los datos.	60
25.-Genotipado de los ratones <i>THKO</i> .	60
IV.-RESULTADOS.	65
1.-Identificación de transcritos quiméricos de tirosina hidroxilasa e insulina: cTH-INS1 y cTH-INS2.	67
2.-Análisis del número de copias del gen <i>cTH</i> en el genoma de pollo.	69
3.-Análisis de la expresión de cTH-INS1 en el embrión de pollo.	70
4.-Análisis <i>in silico</i> de las proteínas cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2.	73
5.-Expresión proteica de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2 en células transfectadas.	75
6.-Niveles y estabilidad transcripcional de los transcritos cTH y cTH-INS1.	76
7.-Estabilidad de las proteínas formadas a partir de cTH y cTH-INS1.	77
8.-Actividad enzimática de las proteínas cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2.	78
9.-Los transcritos quimera cTH-INS1 y cTH-INS2 en otras especies.	79
10.-Análisis de la expresión de cTH.	80
11.-Medida de las catecolaminas en embriones de pollo por HPLC.	84
12.-Efecto de la L-DOPA y de la dopamina administradas	

en microesferas acrílicas de heparina.	85
13.-El efecto de la L-DOPA es región y estadio-dependiente.	87
14.-Efecto de la inhibición de la producción endógena de L-DOPA y dopamina.	89
15.-Efecto de la sobreexpresión de cTH en el corazón embrionario de pollo.	90
16.-Efecto del bloqueo de la expresión endógena de cTH mediado por morfolidos.	93
17.-Análisis de la expresión de <i>TH</i> en embriones de otras especies.	94
17.1.-Estudio de la expresión de la <i>mTH</i> en el embrión de ratón.	94
17.2.-Estudio de la expresión de <i>xTH</i> en el embrión de <i>Xenopus laevis</i> .	96
18.-Células troncales: efecto de la L-DOPA y de la dopamina sobre la expresión de marcadores cardíacos.	97
19.-Células troncales: efecto de la L-DOPA y la dopamina sobre la diferenciación hacia el linaje eritrocítico.	101
V.-DISCUSIÓN.	103
1.-Los transcritos quimera TH-INS1 y TH-INS2, una regulación inusual.	105
2.-Expresión y actividad enzimática de la TH durante el desarrollo embrionario.	108
3. -Análisis del efecto de la L-DOPA y dopamina en el desarrollo embrionario del corazón de pollo.	109
4.-Análisis del efecto de la L-DOPA y de la dopamina en la diferenciación de células troncales.	112
VI.-CONCLUSIONES.	115
VII.-BIBLIOGRAFÍA.	119

A paradigm in molecular biology, lasting for more than two decades, was that one gene gave rise to one protein. Nowadays, it is well-known that one gene can give multiple mRNAs by the usage of different transcription start sites and different polyadenylation sites, and by alternative splicing. Another unexpected source of variability is the formation of transcription induced chimeras (TIC), mRNAs composed of two gene sequences. In this Thesis we describe for the first time TIC in birds. We have found two TIC in chick and quail embryos which contain *tyrosine hydroxylase* (TH) and *insulin* gene sequences. The TIC, named TH-INS1 and TH-INS2 differ in their insulin sequence content. TH-INS1 and TH-INS2 proteins correspond to truncated TH forms that lack the tetramerization domain (TH-INS2) or replace the tetramerization domain with a new amino acid sequence (TH-INS1). Both TH isoforms serve to regulate TH activity, because their enzymatic activity is 6 to 7 times lower than that of canonical TH, and the TIC regulate insulin production since insulin mRNA is interrupted.

TH is the rate limiting enzyme in catecholamines biosynthesis that catalyzes the conversion of L-tyrosine to L-DOPA (catecholamine precursor). We describe in this work the expression pattern of TH during the early chick embryo development. Functional TH is detected since St8, with expression restricted to the heart primordium.

Some authors have proposed a role for catecholamines during heart development (Sarasa and Climent, 1991; Zhou et al., 1995; Kobayashi et al., 1995; Thomas et al., 1995). In this study we show that L-DOPA and dopamine (first catecholamine in catecholamines biosynthesis pathway) added to chick embryos in specific positions, induced the ectopic expression of cardiac markers such as Tbx5, Nkx2.5, AMHC-1 (atrial myosin), VMHC-1 (ventricular myosin). Moreover, these cells not only express cardiac markers but also are morphologically and ultrastructurally cardiomyocytes-like. In contrast, inhibition of endogenous L-DOPA and dopamine production in chick embryos inhibits AMHC-1 and VMHC-1 expression. Using a genetical manipulation approach, we have found that TH over-expression in chick embryos, induces AMHC-1 and VMHC-1 expression. On the other hand, TH blocking by morpholinos inhibits AMHC-1 expression.

We also demonstrate in this Thesis the implication of L-DOPA and dopamine in mouse embryonic stem cells cardiac differentiation. L-DOPA and dopamine induced the expression of the cardiac markers Nkx2.5, GATA4, Tbx5, α MHC and TT2. In parallel, we observed that L-DOPA and dopamine blocked the erytroid lineage differentiation.

I.-INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario se producen procesos de proliferación, muerte, diferenciación y migración celular, por los que a partir de una única célula, el cigoto, se originan diferentes tipos celulares que se organizan para formar los órganos y tejidos que constituyen un individuo. Estos procesos están finamente orquestados por factores de transcripción responsables de la activación o inhibición de programas genéticos específicos, y por una red de moléculas reguladoras de diferente naturaleza química. Recientemente, se ha visto que hormonas peptídicas como la hormona del crecimiento, prolactina e insulina se sintetizan en el embrión antes de la diferenciación de las glándulas endocrinas encargadas de su producción en el organismo adulto (De Pablo y Roth, 1990; Yang y cols., 1999; Hernández-Sánchez y cols., 2006 (referencia 89); Sanders y Harvey, 2004). Las regiones del embrión en las que se producen estas hormonas son diferentes a las del organismo adulto. Por ejemplo, la insulina se genera en las células β -pancreáticas de vertebrados adultos, mientras que en el embrión en gastrulación y neurulación se encuentra ampliamente distribuida en las tres capas embrionarias (De Pablo y Roth, 1990; Pérez-Villamil y cols., 1994; Hernández-Sánchez y cols., 2002). Estas hormonas peptídicas presentes en los estadios iniciales del desarrollo embrionario, tienen un papel autocrino/paracrino distinto del papel endocrino que presentan en el organismo adulto. Así, la insulina en el organismo adulto es conocida como la hormona metabólica crítica en el anabolismo de los carbohidratos, mientras que en el embrión de pollo prepancreático (gastrulación y neurulación), la insulina y su precursor la proinsulina son factores de supervivencia celular (Morales y cols., 1997; Hernández-Sánchez y cols., 2002), además, la proinsulina está involucrada en la diferenciación cardíaca (Mansilla y cols., 2005). La prolactina en el organismo adulto regula el ciclo reproductivo, y estimula la secreción láctea en mamíferos. Durante el desarrollo embrionario, la prolactina presenta propiedades angiogénicas o anti-angiogénicas, dependiendo de si actúa la molécula completa o sólo un fragmento de ella, respectivamente (Struman y cols., 1999). La hormona del crecimiento presenta efecto condrogénico y angiogénico en embrión de pollo (Meier y Solursh, 1973; Gould y cols., 1995), y efecto antiapoptótico en embriones bovinos en fase de blastocisto (Kölle y cols., 2003).

Un patrón de expresión y una función embrionarias distintas a las presentes en los organismos postnatales podrían requerir mecanismos de regulación alternativos. En los últimos años, nuestro grupo ha descrito la generación de transcritos de insulina embrionarios alternativos al transcrito expresado en el páncreas (Hernández-Sánchez y cols., 2003; Mansilla y cols., 2005) que difieren de éste en su actividad traduccional. Caracterizando los transcritos alternativos de insulina, hemos hallado una inesperada expresión temprana del gen de la *tirosina hidroxilasa* (TH). En este proyecto de Tesis

Doctoral he abordado la caracterización de la enzima TH como un nuevo elemento importante en la regulación del desarrollo cardíaco.

1.-La tirosina hidroxilasa: inicio de la síntesis de catecolaminas.

La TH (E.C. 1.14.16.2) es la enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas (Nagatsu y cols., 1964; Levitt y cols., 1965) (**Fig. 1**), pertenece al grupo de las monooxigenasas y cataliza la conversión de L-tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La dopamina es la primera catecolamina que se forma en la ruta, mediante descarboxilación de la L-DOPA por la aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), que elimina el grupo ácido de la cadena lateral. La siguiente reacción de la ruta, catalizada por la dopamina β -hidroxilasa (D β H), convierte la dopamina en noradrenalina y esta pasa a adrenalina por la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT).

En los organismos postnatales, las enzimas implicadas en la biosíntesis de catecolaminas tienen expresión específica de tejido, excepto la AADC, que es ubicua. Los principales sitios de síntesis de catecolaminas son, en el organismo adulto, el sistema nervioso central y periférico (sistema nervioso simpático) y en las glándulas adrenales. En el sistema nervioso central, se encuentran las neuronas dopaminérgicas (productoras de dopamina) localizadas en el cerebro medio, en la *Substantia nigra* y en el área tegmental ventral. La noradrenalina se produce en el sistema nervioso central, principalmente en el *Locus coeruleus*, situado en el tronco del encéfalo, en las inervaciones simpáticas de la mayor parte de los órganos, y en menor proporción en la médula adrenal. La adrenalina se sintetiza mayoritariamente en la médula adrenal, y en una proporción muy baja en el sistema nervioso central.

Las catecolaminas contienen en su estructura un grupo catecol (un anillo bencénico con dos grupos hidroxilos), y un grupo amino en la cadena lateral alifática. En los organismos postnatales, la dopamina y noradrenalina actúan como neurotransmisores sobre las terminales post-sinápticas, y en algunos casos, sobre las propias terminales pre-sinápticas desde las que son liberadas. La adrenalina actúa principalmente siendo liberada al torrente sanguíneo desde la médula adrenal. Las catecolaminas son catabolizadas por dos enzimas que presentan expresión ubicua en el organismo: la monoaminoxidasa (MAO) y la catecoloximetiltransferasa (COMT).

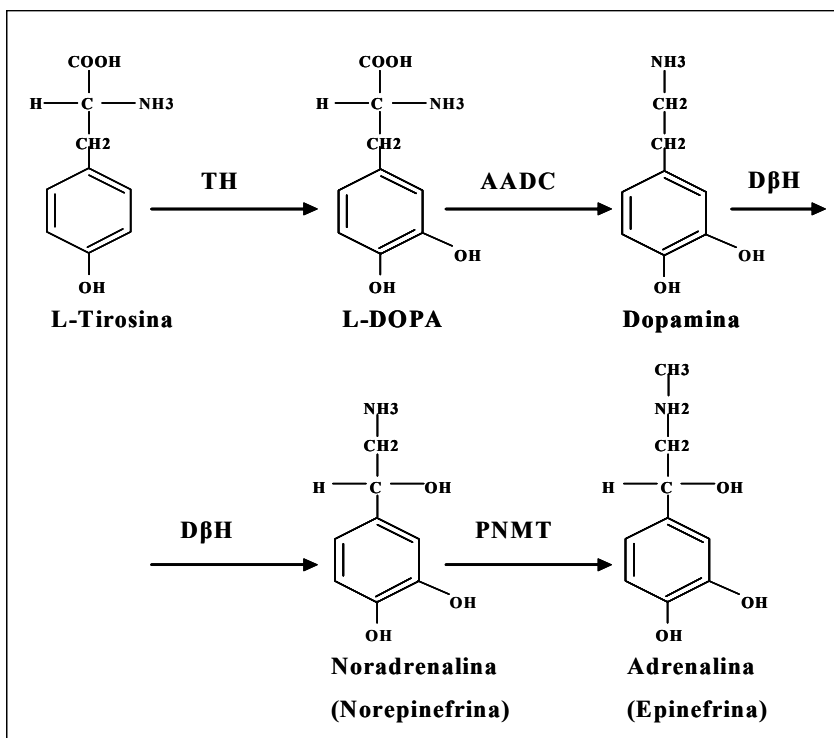


Figura 1.-Ruta de biosíntesis de catecolaminas.

Sobre cada flecha se indica la enzima que cataliza la reacción.

TH: tirosina hidroxilasa; AADC: aminoácido aromático descarboxilasa; DβH: dopamina β-hidroxilasa; PNMT: feniletanolamina N-metiltransferasa.

2.-La tirosina hidroxilasa: la proteína y el gen.

La TH está formada por unos 500 aminoácidos (aa) (528 en humano, 498 en rata y ratón, 491 en pollo y 454 en *Caenorhabditis elegans*). Presenta en todas las especies un dominio regulador situado en el extremo amino terminal, un dominio catalítico y un dominio de tetramerización situados en el extremo carboxilo terminal. En la TH de rata, la mejor caracterizada estructuralmente, el dominio regulador comprende los primeros 155 aa del extremo amino terminal (Daubner y cols., 1993). El extremo carboxilo terminal (aa 156-498), compuesto por 14 hélices α y 8 láminas β (Goodwill y cols., 1997), contiene el dominio catalítico entre los aa 188 y 456 (Lohse y Fitzpatrick, 1993), y el dominio de tetramerización entre los aa 457 y 498 (Goodwill y cols., 1997) (**Fig. 2A**). El núcleo central del dominio de tetramerización está formado por los 24 residuos de la hélice α -14, en los que reside un heptámero o cremallera de leucinas (L) (**Fig. 2A**). Cada monómero de TH se une a otro para formar dímeros, y estos se unen a través del dominio de tetramerización para formar homotetrámeros (**Fig. 2B**) (Daubner y cols., 1993).

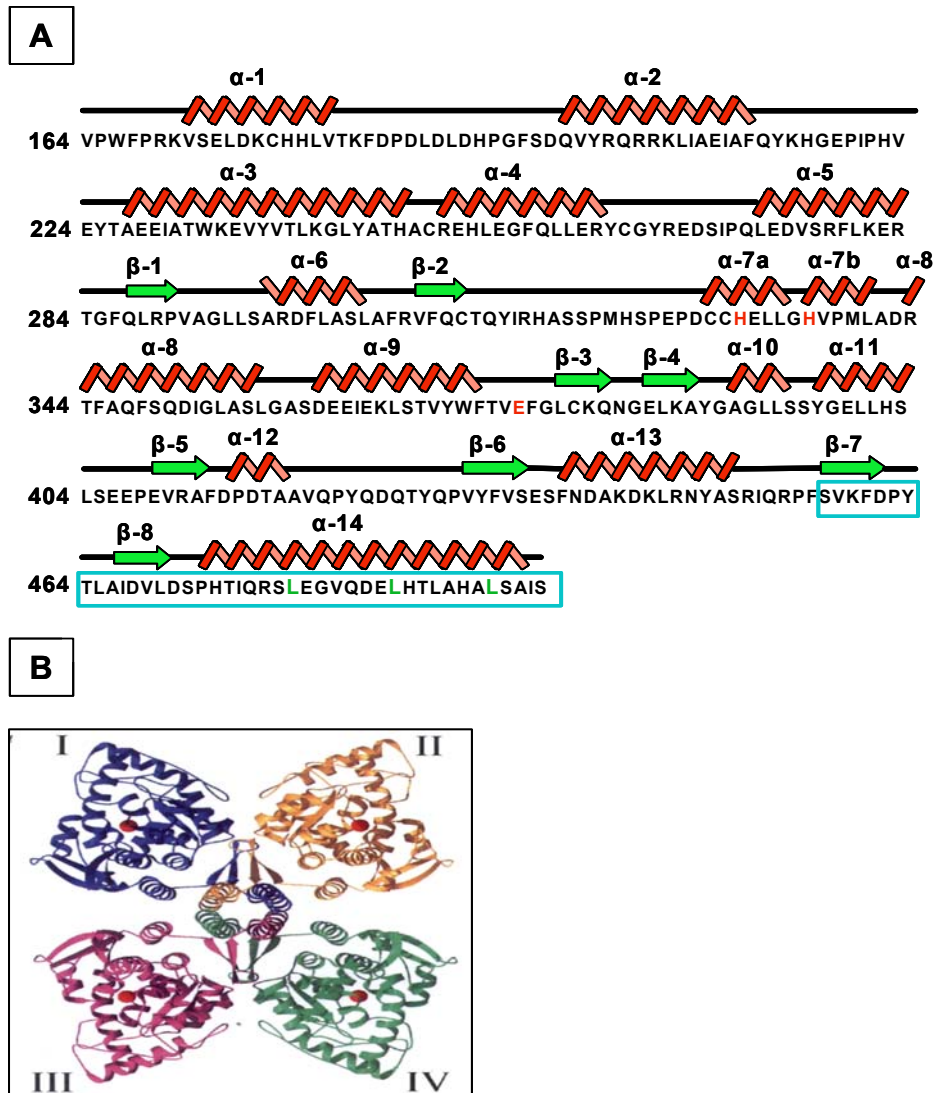


Figura 2.-Estructura tridimensional de la TH.

(A) Estructura secundaria del extremo carboxilo terminal de la TH de rata, desde el aminoácido 164. Las α -hélices y las β -láminas se muestran numeradas. Los aa del dominio de tetramerización aparecen bordeados por un rectángulo azul, y los aminoácidos de la cremallera de leucinas (L) aparecen resaltados en verde. Los aa de unión a hierro aparecen resaltados en rojo. (B) Estructura tetramérica de la TH de rata (extraída de Goodwill y cols., 1997). Cada monómero aparece representado en un color y etiquetado con números romanos.

La actividad enzimática de la TH depende de su estado de oligomerización. La forma completamente funcional es la tetramérica, mientras que las formas monoméricas y dimericas presentan actividad parcial (Lohse y Fitzpatrick, 1993; Vrana y cols., 1994).

La TH es activada mediante fosforilación en cuatro residuos de serina del dominio regulador por varias quinasas: la proteína quinasa A (Joh y cols., 1978), la proteína quinasa II dependiente de calcio-calmodulina (Yamauchi y cols., 1981), la proteína quinasa C (PKC) (Albert y cols., 1984), y quinasas ERK (Haycock y cols., 1992). Los cambios alostéricos producidos por mucopolisacáridos sulfurados (Kuczenski y

Mandell, 1972) también activan la enzima. Por el contrario, los productos de la ruta, la dopamina, noradrenalina y adrenalina, bloquean la actividad enzimática de la TH (Andersson y cols., 1988 y 1992; Gordon y cols., 2008).

El gen de la *TH* presenta una organización sinténica con el gen de la *insulina*, situándose el gen de la *TH* en posición 5' con respecto al de la *insulina*. Esta organización en tándem se mantiene desde invertebrados (*Drosophila melanogaster*, *C. elegans*) a vertebrados (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*). La distancia intergénica es variable dependiendo de las especies, llegando a ser de 14 kilobases (kb) en pollo, mientras que en humanos es aproximadamente de 2 kb.

El gen de la *TH* está formado por 14 exones en humanos y 13 exones en rata, ratón y pollo. Los niveles de mRNA están regulados positivamente por glucocorticoides y AMPc (Lewis y cols., 1983 y 1987; Coker y cols., 1988). El ácido retinóico, dependiendo del tipo celular, regula positiva o negativamente los niveles de mRNA de TH, aumentándolos en células de neuroblastoma humanas y células PC12 (Jeong y cols., 2006) y disminuyéndolos en neuronas simpáticas de rata en cultivo (Kobayashi y cols., 1994). En humanos los exones 1 y 2, y en rata los exones 2 y 11 presentan procesamiento alternativo, generando proteínas TH que difieren en el dominio regulador (Grima y cols., 1987; Lewis y cols., 1993; Schussler y cols., 1995). El mRNA de TH es estabilizado por la PKC (Vyas y cols., 1990) y su traducción es activada por la L-DOPA (Rodríguez-Martín y cols., 2001).

3.-Receptores para catecolaminas.

Las catecolaminas ejercen su función principalmente a través de receptores de membrana acoplados a proteínas G. Los receptores dopaminérgicos son específicos para dopamina, y los adrenérgicos unen noradrenalina y con mayor afinidad adrenalina.

Se han descrito 5 receptores para dopamina (D₁-D₅) que se clasifican en dos familias: D₁ y D₂. Dentro de la familia D₁, se encuentran los receptores D₁ y D₅. A la familia D₂ pertenecen los receptores D₂, D₃ y D₄. Los receptores de la familia D₁ están acoplados a proteínas G_s, y transducen la señal estimulando la producción de AMPc. Los receptores de la familia D₂ están acoplados a proteínas G_{ai} y G_{ao} que inhiben la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de Ca²⁺ a través de canales dependientes de voltaje.

Los receptores adrenérgicos se clasifican en dos familias: α y β . La familia α a su vez se subdivide en: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} . La familia β , se subdivide en β_1 , β_2 y β_3 (Goodman y Gilman, 2007). Los receptores α_1 están acoplados a proteínas G_q, los α_2 a proteínas G_i o G_o (Aantaa y cols., 1995; Bylund, 1992) y los receptores β , a proteínas G_s (Lefkowitz, 2000).

La L-DOPA, aparte de intermediario metabólico de la ruta de biosíntesis de catecolaminas, así como de la ruta de biosíntesis de melanina, presenta efectos fisiológicos sobre la proliferación y diferenciación celular. Recientemente se ha comprobado que la L-DOPA se une al receptor de membrana OA1, también acoplado a proteínas G (López y cols., 2008), que se expresa en células pigmentadas.

4.-Presencia y función de las catecolaminas:

4.1.-En el organismo adulto.

En el organismo adulto, las catecolaminas ejercen su acción como neurotransmisores y como hormonas. La función neurotransmisora la llevan a cabo la dopamina y noradrenalina en el sistema nervioso central y la noradrenalina en el sistema nervioso simpático. La función hormonal la lleva a cabo principalmente la adrenalina y, en menor medida, la noradrenalina, secretadas desde la médula adrenal.

Las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia nigra* controlan el movimiento, y su degeneración produce la enfermedad de Parkinson (Barzilai y Melamed, 2003). Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral emiten sus proyecciones al *Nucleus accumbens*, al núcleo estriado dorsal, la corteza, y otras áreas límbicas del cerebro implicadas en el control del aprendizaje (Day, 2008) y del comportamiento emocional (Tzschentke y Schmidt, 2000). El funcionamiento anormal de estas neuronas está implicado en trastornos del comportamiento como el trastorno bipolar (Miklowitz y Johnson, 2006), depresión melancólica (Malhi y Berk, 2007) y esquizofrenia (Murray y cols., 2008).

Las neuronas productoras de noradrenalina envían sus proyecciones al hipotálamo, tálamo, sistema límbico y corteza cerebral, y están implicadas en las situaciones de vigilia y en la memoria emocional. La noradrenalina también se ha asociado a trastornos del comportamiento como el trastorno de falta de atención/hiperactividad (Biederman y Spencer, 1999). La noradrenalina presente en el área subcortical es la encargada del control muscular (Lambert y cols., 1997). Tanto la noradrenalina como la adrenalina aumentan la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea sistólica y disminuyen el flujo sanguíneo renal. Sin embargo, la adrenalina produce vasodilatación vascular periférica, mientras que la noradrenalina, globalmente produce vasoconstricción.

La adrenalina prepara al organismo para la reacción conocida como de “lucha o huida”, que consiste en un aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria, y dilatación de las pupilas.

4.2.-En el desarrollo embrionario.

Las catecolaminas, las enzimas de su ruta de biosíntesis y los receptores adrenérgicos y dopaminérgicos han sido detectados en estadios embrionarios previos a la formación de las estructuras encargadas de su síntesis en el organismo adulto. En embriones de pollo, las enzimas aparecen de forma secuencial, detectándose la TH desde día embrionario 1 (E1), la AADC desde E2 y las enzimas D β H y PNMT desde E4 y E6 respectivamente. La L-DOPA se detectó desde E1, la dopamina desde E2, y la noradrenalina y la adrenalina desde E3 (Ignarro y Shideman, 1968). La detección de noradrenalina y adrenalina, previa a la detección de las enzimas que catalizan su producción, sugiere que o bien las enzimas no se encontraron por la falta de sensibilidad de las técnicas usadas en la época, o bien que hay una incorporación de noradrenalina y adrenalina por parte del embrión a partir de la yema del huevo.

En embriones de ratón los mRNAs de los receptores adrenérgicos α_{2c} , β_2 y β_3 y las proteínas de α_{2c} , β_2 , se detectaron en la mórula de 8 y 16 células y en el blastocisto (Cikos y cols., 2005 y 2007).

La función de las catecolaminas embrionarias es diferente a la descrita en organismos postnatales. Lawrence y Burden en 1973 comprobaron tras la administración de AMPT (inhibidor de la TH) o nialamida (inhibidor de la MAO) al embrión de pollo, que las catecolaminas están implicadas en los movimientos morfogenéticos, cierre de neuroporos y torsión del embrión. Sarasa y Climent (1987) observaron que la inyección sub-blastodérmica de catecolaminas en embriones de pollo producía una modificación de los movimientos morfogenéticos que tienen lugar durante la gastrulación, dando lugar a un engrosamiento de la línea primitiva.

Los ratones nulos para el gen de la TH (Zhou y cols., 1995; Kobayashi y cols., 1995) así como para el gen de la D β H (Thomas y cols., 1995) son letales embrionarios. El análisis fenotípico de ambos modelos indica que la letalidad es producida por fallo cardíaco.

Los ratones albinos mutantes en el gen de la *tirosinasa*, enzima implicada en la síntesis de melanina que genera L-DOPA como metabolito intermediario, presentan deficiencias visuales. La falta de L-DOPA en la retina embrionaria produce alteraciones en procesos de proliferación y diferenciación celular de la neuro-retina (Ilia y Jeffery, 1999).

En el telencéfalo de embrión de ratón de E15, la dopamina, a través de receptores D $_1$, induce la diferenciación neural, y a través de receptores D $_2$, la proliferación de los precursores gliales (Popolo y cols., 2004). En el neoestriado de embrión de ratón de E13, la dopamina favorece la progresión de la fase G $_1$ a S del ciclo celular, cuando activa receptores D $_2$, mientras que la reduce cuando activa receptores D $_1$ (Ohtani y cols., 2003).

4.2.1.-En el desarrollo embrionario del corazón.

En 1996, Huang y colaboradores describieron por primera vez la presencia de células con capacidad para sintetizar catecolaminas en el corazón embrionario y adulto humano, y en el corazón adulto de rata, que denominaron células ICA (del inglés *Intrinsic Cardiac Adrenergic*). Estas células que se encontraban aisladas o formando grupos en aurículas y ventrículos, o asociadas a la microvasculatura, expresan las enzimas de la ruta de biosíntesis de catecolaminas y, al contrario que las neuronas del sistema nervioso simpático, presentan vesículas claras por microscopía electrónica.

Posteriormente, Ebert y Thompson (2001) describieron la presencia transitoria de células ICA en el corazón de embriones de rata de E11,5, estadio previo a la inervación simpática del corazón, en las regiones que posteriormente dan lugar a los nodos sinoauricular y aurículo-ventricular. Estas células no se detectaron a partir de E12,5.

En corazones de embriones de pollo, la noradrenalina y la adrenalina se detectaron desde E3, la L-DOPA desde E4 y la dopamina desde E6 (Ignarro y Shideman, 1968).

Varios estudios sugieren que las catecolaminas podrían tener un papel en la formación del corazón. Embriones de pollo inyectados en la cavidad sub-blastodérmica con dopamina, presentaban corazones de mayor tamaño que los controles (Sarasa y Climent, 1987). Así mismo, las células de estos embriones inyectados con dopamina, sometidas a disgregación celular y posterior reagregación, daban lugar principalmente a células cardíacas. De igual forma, regiones caudales de embrión de pollo en gastrulación, las cuales no están determinadas a formar parte del corazón, cultivadas en presencia de dopamina se diferenciaban a cardiomiocitos, de una forma dosis dependiente (Sarasa y Climent, 1991). Como hemos mencionado, los ratones nulos tanto para el gen de la *TH* (Zhou y cols., 1995; Kobayashi y cols., 1995) como el de la *DβH* (Thomas y cols., 1995) son letales embrionarios. Ambos presentan bradicardia, y en algunos de ellos se aprecia dilatación auricular y desorganización de los cardiomiocitos ventriculares.

5.-El corazón adulto en distintas especies.

El corazón es el órgano encargado de bombear la sangre a las diferentes regiones del organismo. El corazón más rudimentario se encuentra en *Drosophila*, y está formado por un tubo en forma de U, que se conoce como vaso dorsal (**Fig. 3A**). En peces, el corazón también es tubular, pero se encuentra regionalizado; está formado por un ventrículo y una aurícula que no presentan separación física, pero sí válvulas rudimentarias (**Fig. 3B**). En anfibios, así como en la mayoría de los reptiles, el corazón es tricamérico, y está formado por dos aurículas y un ventrículo no tabicado, altamente

trabeculado. Entre las aurículas y el ventrículo se encuentra la válvula aurículo-ventricular (**Fig. 3C**). En aves y mamíferos, el corazón es tetracamérico, compuesto por dos aurículas separadas por el septo interauricular y dos ventrículos separados por el septo interventricular (**Fig. 3D**).

En vertebrados, el corazón está rodeado de una capa de células epiteliales denominada epicardio. Entre el epicardio y el miocardio se encuentra el subepicardio, una región de matriz extracelular y células mesenquimales (Muñoz-Chapuli y cols., 2002).

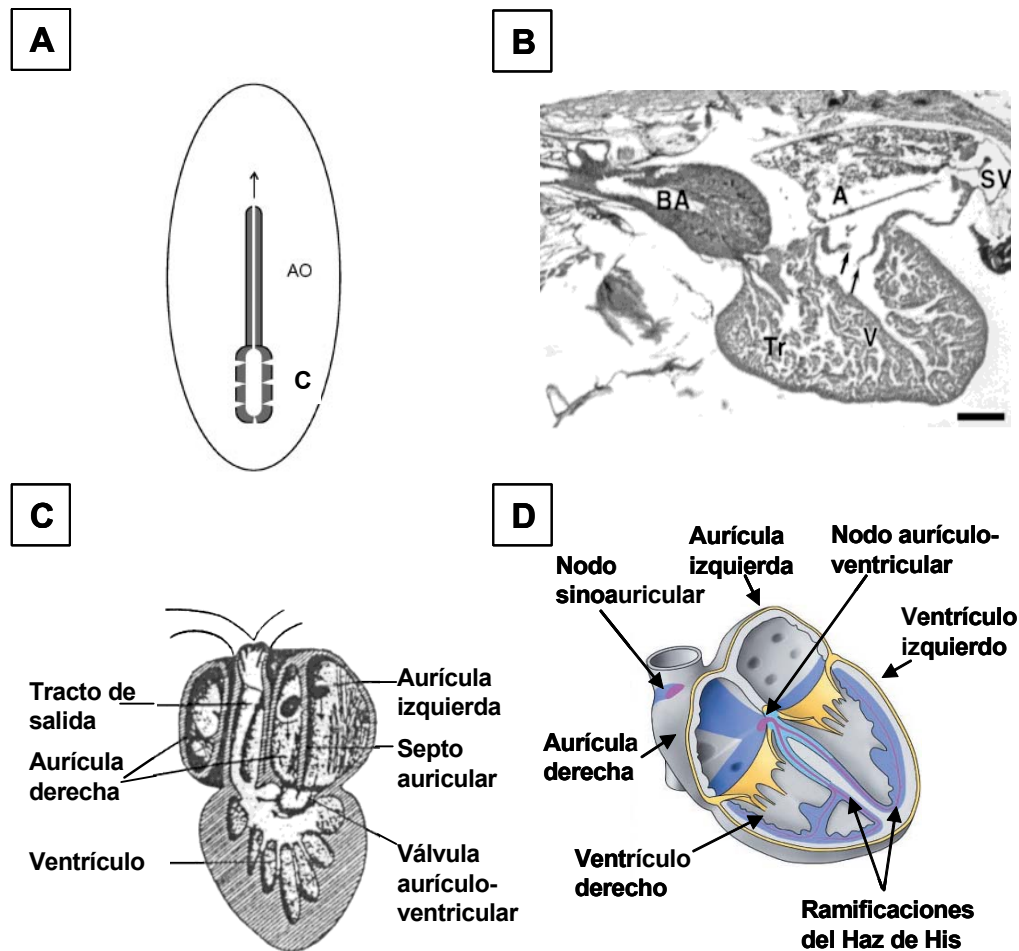


Figura 3.-Diferentes tipos de corazón adulto.

(A) Dibujo modificado de Zaffran y Frasch (2002) del corazón tubular (C) de *Drosophila*. (B) Foto de una sección transversal de corazón adulto de pez cebra (extraída de Lohr y Yost, 2000). (C) Dibujo del corazón adulto de *Xenopus* (modificada de Lohr y Yost, 2000). (D) Dibujo representativo del corazón adulto de aves y mamíferos (extraído de Moorman y Christoffels, 2003). A: aurícula; AO: aorta; BA: *Bulbus arteriosus*; SV: *Sinus venosus*; Tr: trabécula; V: ventrículo.

6.-Formación del corazón embrionario.

El corazón es el primer órgano que se forma, apareciendo las primeras estructuras cardíacas en la fase final de la gastrulación.

6.1.-Formación del asa cardíaca.

Al inicio de la gastrulación, el embrión está formado por dos capas embrionarias, el epiblasto y el hipoblasto. Durante la gastrulación, las células del epiblasto migran convergiendo en la línea primitiva (**Fig. 4A**) e ingresan a través de ésta, dando lugar a un embrión formado por tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo). Durante este proceso, las células del epiblasto sufren la primera transición epitelio-mesénquima.

En el embrión de pollo de estadio (St) 3 de Hamburger y Hamilton (1951) las células que van a originar el corazón migran a través de los 2/3 más rostrales de la línea primitiva (**Fig. 5A**). A su vez, la migración de los precursores cardíacos está regionalizada rostro-caudalmente, así, las células que migran más rostralmente formarán el polo arterial (*Bulbus cordis*), seguidas de las del ventrículo, aurícula y polo venoso (*Sinus venosus*) (García Martínez y Schoenwolf, 1993) (**Fig. 5A**). En ratón, a diferencia del pollo, esta migración no está regionalizada, al encontrarse miocardiocitos provenientes de una misma célula progenitora a lo largo del tubo cardíaco (Meilhac y cols., 2003).

Un subconjunto de las células mesodérmicas que ingresan por la línea primitiva migran antero-lateralmente, situándose a ambos lados de la línea primitiva (Rosenquist, 1970; Yang y cols., 2002), formando en St5 de pollo o E7,5 de ratón dos regiones separadas y pareadas conocidas como *Hfr* (del inglés *Heart forming region*) (**Fig. 4B**) (**Tabla 1**). En este momento, en el mesodermo de la placa lateral se distinguen dos regiones: el mesodermo dorsal somático y el mesodermo ventral esplácnico, dejando entre ambos un hueco que corresponde a la cavidad celómica (Abu-Issa y Kirby, 2007). El mesodermo esplácnico se corresponde con el mesodermo precardiogénico (Virágh y cols., 1989). Los precursores cardíacos continúan migrando hacia la región anterior y medial del embrión, formando los primordios cardíacos (**Fig. 4C**), que se sitúan en posición caudal con respecto a la cabeza, y se aproximan a la línea media para fusionarse (**Fig. 4D**) (Wagner y Siddiqui, 2007).

En pollo, el momento de la fusión de los primordios cardíacos es un tema controvertido. Así, para algunos autores esta fusión se produce en St6 (DeHaan, 1963; Jiang y cols., 1998; Bruneau y cols., 1999; Yamada y cols., 2000), mientras que otros consideran que se produce en St9 (Stalsberg y DeHaan, 1969; Colas y cols., 2000). Previo a la fusión de los primordios cardíacos, las células del mesodermo cardíaco se diferencian en progenitores miocárdicos y endocárdicos (Lough y Sugi, 2000).

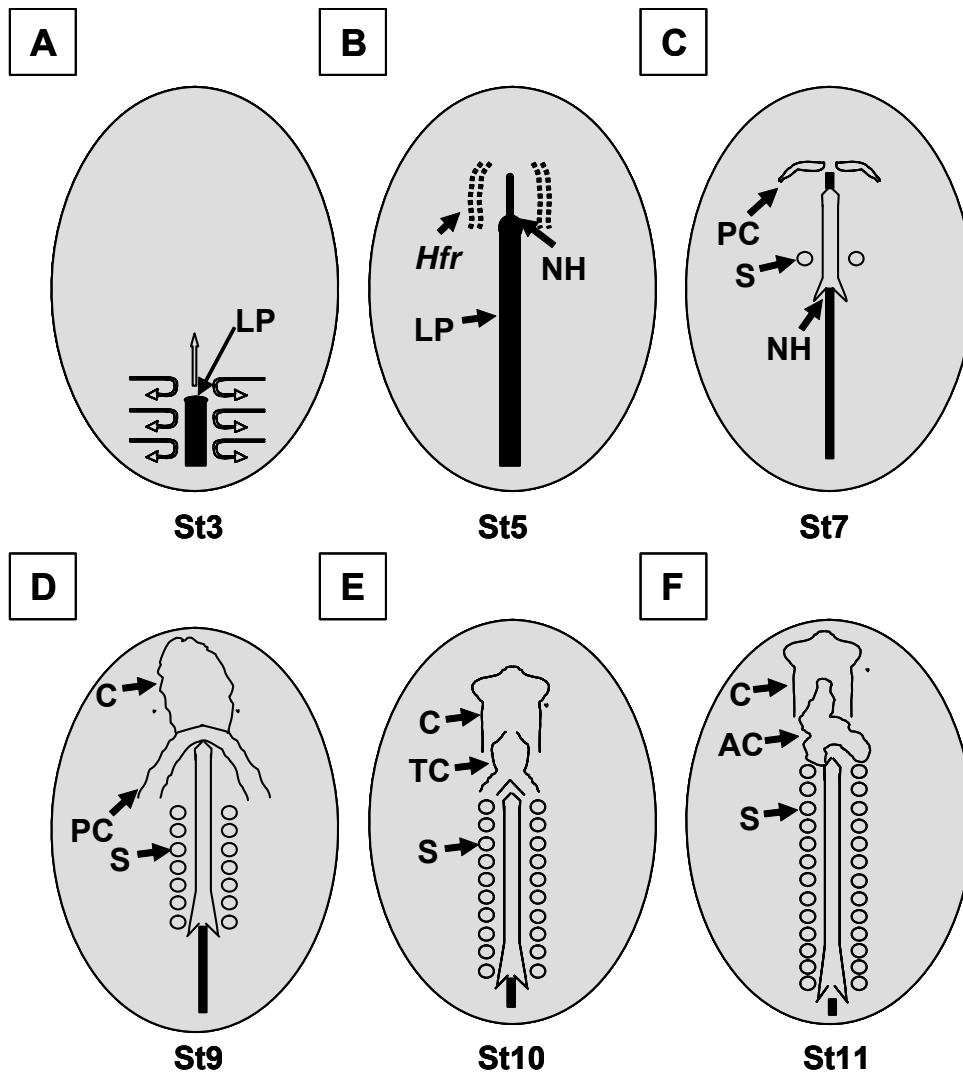


Figura 4.-Representación esquemática de los estadios iniciales del desarrollo embrionario del corazón de pollo.

(A) Movimientos de las células del epiblasto (flechas) en embrión de St3 para formar el mesodermo. (B) Embrión de St5 en el que se representan las células del *Hfr* como líneas discontinuas. (C) Embrión de St 7 en el que se muestran los primordios cardíacos (PC) aproximándose a la línea media del embrión. (D) Embrión de St9 en el que los primordios cardíacos (PC) en posición caudal con respecto a la cabeza (C) se han fusionado. (E) En el embrión de St10 se forma el tubo cardíaco (TC) en la posición medial del embrión. (F) En St11, el tubo cardíaco se ha girado hacia la derecha para formar el asa cardíaca (AC). LP: línea primitiva; NH: Nódulo de Hensen; S: somita.

En embrión de pollo de St10 (Abu-Issa y Kirby, 2007; Moorman y cols., 2007) (**Fig. 4E**) y en embrión de ratón de E7,8 (Abu-Issa y Kirby, 2007) los primordios cardíacos ya fusionados forman el tubo cardíaco lineal, que está conectado al embrión a través del mesocardio dorsal (Snarr y cols., 2008). El tubo está compuesto por una capa externa de miocardio y otra interna de endocardio, conectadas por matriz extracelular (Eisenberg y Markwald, 1995).

Conforme avanza el desarrollo, el tubo cardíaco se elonga tanto por el polo arterial (porción rostral) como por el polo venoso (porción caudal) y en St11 (E1,5) en embrión de pollo y E8,5 en embrión de ratón (**Tabla 1**), se curva hacia la derecha para formar el asa cardíaca (Männer, 2004). Este plegamiento restringe la presencia de mesocardio dorsal a las regiones anterior y posterior del corazón (Drake y cols., 2006). Durante la formación del asa cardíaca, las cámaras ventriculares pasan de estar alineadas rostro-caudalmente, a tener un alineamiento izquierda/derecha (Brown y Anderson, 1999; Männer, 2000).

6.2.-Los campos cardíacos primario y secundario (CCP y CCS).

Estudios realizados en los últimos años, han puesto de manifiesto la existencia de otra fuente de precursores cardíacos mesodérmicos, procedentes del que ha sido denominado campo cardíaco secundario (CCS) (Srivastava, 2006; Buckingham y cols., 2005). Las células del CCS expresan marcadores moleculares específicos como Isl1, FGF8 o FGF10 en ratón y FGF8 y HNK1 en pollo.

La contribución de las células del CCS a la formación del corazón varía entre ratón y pollo.

En embrión de ratón, las células del CCS se localizan en el mesodermo faríngeo (Kelly y cols., 2001; Cai y cols., 2003), y contribuyen a la formación del tracto de salida, el ventrículo derecho, así como determinadas regiones auriculares (Kelly y cols., 2001; Cai y cols., 2003; Zaffran y cols., 2004; Ilagan y cols., 2006) (**Fig. 5C**).

En embrión de pollo, la localización del CCS varía dependiendo de los estudios. Waldo y colaboradores sitúan el CCS en una posición posterior y adyacente al tracto de salida del corazón (Waldo y cols., 2001) (**Fig. 5B en naranja**), mientras que Mjaatvedt y colaboradores (Mjaatvedt y cols., 2001) postulan que las células del CCS se encuentran en el mesodermo faríngeo craneal, extendiéndose a los arcos faríngeos (**Fig. 5B en azul**). Las células del CCS en embrión de pollo contribuyen únicamente a la formación del tracto de salida del corazón (**Fig. 5B**).

Actualmente, la definición de uno o dos campos cardíacos es un tema controvertido. Algunos autores consideran que existe un único campo cardíaco en el que las células mesodérmicas sufren dos oleadas de diferenciación separadas en el tiempo (Moorman y col., 2007).

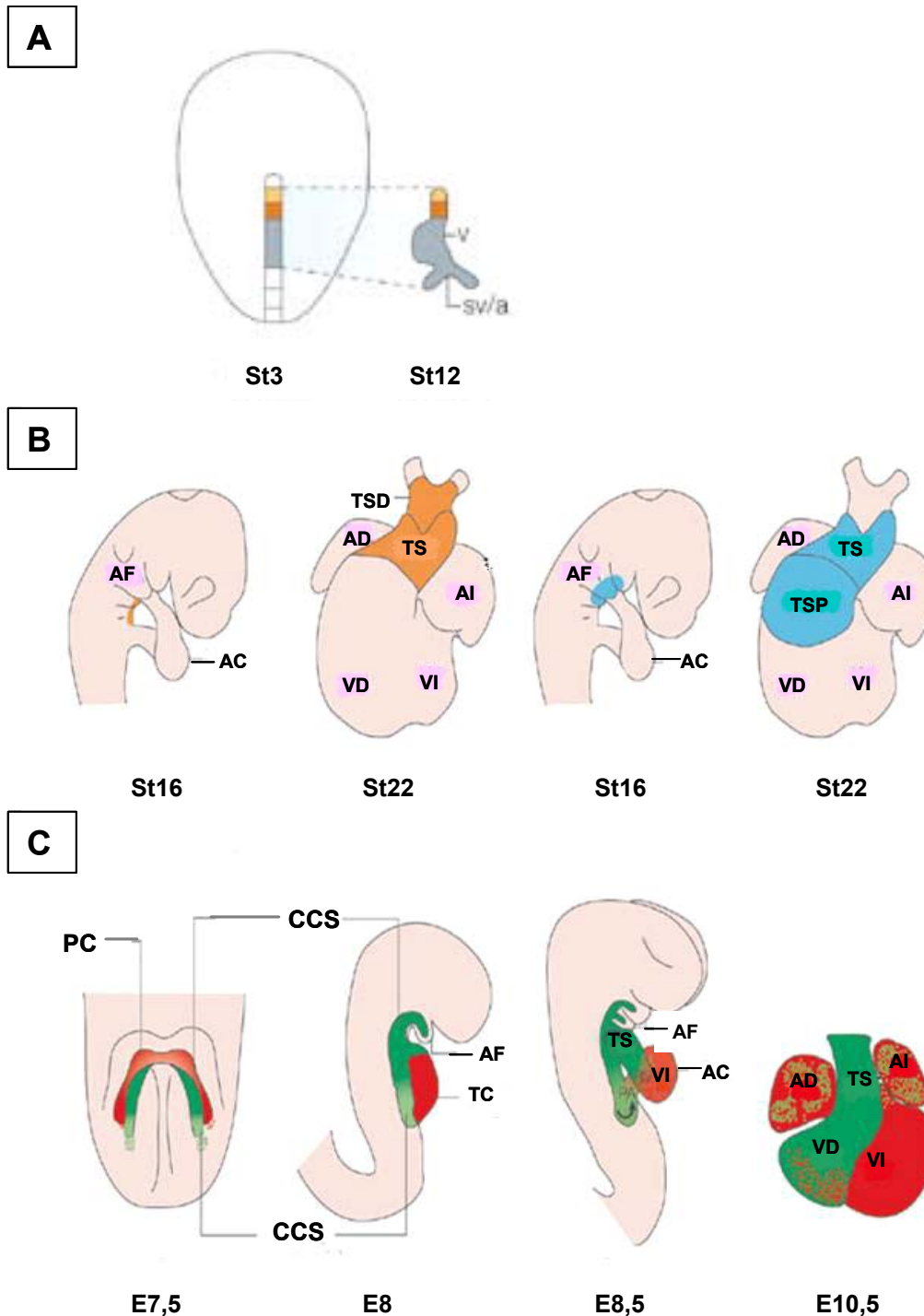


Figura 5.-Contribución de las células del CCP y CCS a la formación del corazón en pollo y ratón.

(A) Dibujo de la regionalización de la línea primitiva de embrión de pollo de St3 y la contribución de las células que migran a través de ella al corazón de St12. V: ventrículo; sv/a: Sinus venosus/aurícula.

(B) Posición en el embrión de pollo de St16 de las células del CCS y su contribución a la formación del corazón tetracamérico de St22 según los resultados de Waldo y colaboradores (2001) (en naranja) y de Mjaatvedt y colaboradores (2001) (en azul).

(C) Posición y contribución de las células del CCP (rojo) y del CCS (verde) a la formación del corazón tetracamérico de ratón.

Todos los dibujos de esta figura han sido modificados de Buckingham y colaboradores (2005).

AC: asa cardíaca; AD: aurícula derecha; AF: arcos faríngeos; AI: aurícula izquierda; CCS: campo cardíaco secundario; PC: primordios cardíacos; TC: tubo cardíaco; TS: tracto de salida; TSD: tracto de salida distal; TSP: tracto de salida proximal; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo.

Tabla 1.-Desarrollo embrionario temprano del corazón de pollo y ratón.

	Pollo	Ratón
Migración precursores cardíacos (gastrulación)	St4	E7
Posicionamiento precursores en la placa lateral	St5	E7
Formación del tubo cardíaco	St9	E8
Contracción cardíaca	St10	E8,5
Formación del asa cardíaca	St11	E8,5

Datos extraídos de Evans (1999).

St: estadios de pollo establecidos por Hamburger y Hamilton (1951). St: HH

E: estadios de ratón en días embrionarios.

6.3.-El sistema de conducción cardíaco.

El sistema de conducción está formado por el nodo sinoauricular, el nodo aurículo-ventricular, el haz de His y las fibras de Purkinje (**Fig. 3D**).

El nodo sinoauricular está situado en la parte derecha del corazón, en contacto directo con la vena cava (Mommersteeg y cols., 2007). El nodo aurículo-ventricular se encuentra entre la aurícula y el ventrículo derecho (Boullin y Morgan, 2005). El haz de His se extiende a lo largo del septo interventricular, y se ramifica en tres: una ramificación hacia el ventrículo derecho, y las otras dos hacia las regiones anterior y posterior del ventrículo izquierdo. De las ramificaciones salen unos filamentos conocidos como las fibras de Purkinje.

El nodo sinoauricular es el marcapasos del corazón, lugar donde se origina el impulso eléctrico, que es transmitido al nodo aurículo-ventricular, se propaga por el haz de His a las fibras de Purkinje y éstas transmiten el impulso eléctrico a los cardiomiocitos del ventrículo (Canale y cols., 1986). Las células de los nodos sinoauricular y aurículo-ventricular presentan un menor número de fibras sarcoméricas que los miocardiocitos del “miocardio de trabajo” de las aurículas y ventrículos especializados en la contracción celular.

Aunque todos los elementos del sistema de conducción se originan a partir del mesodermo precardiogénico (Wu y cols., 2006) ha habido cierta controversia en el mecanismo por el que ocurre la diferenciación de las células mesodérmicas para formar los nodos sinoauricular y aurículo-ventricular. Algunos grupos apoyan la idea de que las células del miocardio primitivo que van a formar parte de los nodos “escapan” a la

diferenciación a cardiomiocitos de trabajo (Moorman y Christoffels, 2003; Moorman y cols., 1998). Sin embargo, Cheng y colaboradores (1999) apoyan la idea de que las células de los nodos se forman mediante el reclutamiento de miocardiocitos de la aurícula. La aparición reciente del ratón nulo del gen *Tbx3*, cuya expresión está restringida al nodo sinoauricular, y los estudios de trazado de linaje con el ratón *Cre* bajo las secuencias reguladoras de *Nppa*, sustentan la idea de la proliferación celular en el nodo sinoauricular y descartan la teoría del reclutamiento de los miocardiocitos auriculares (Hoogaars y cols., 2007).

Se piensa que los haces de His derivan de las trabéculas de los ventrículos (Vassall-Adams, 1982; Moorman y cols., 1998) y al igual que éstas poseen un bajo potencial contráctil, y alto contenido en uniones *Gap* (Canale y cols., 1986), ricas en Cx40 y Cx43 (Fromaget y cols., 1992; Gourdie y cols., 1992).

7.-Señales que actúan positiva y negativamente en el desarrollo embrionario del corazón.

Durante el desarrollo embrionario, las células de los distintos territorios sufren procesos de especificación, determinación y diferenciación para dar lugar a los diferentes tejidos del organismo adulto. Hasta la fecha, no se conocen marcadores de especificación cardíaca, con lo que es muy difícil determinar el momento exacto en el que se produce. La determinación cardíaca es un proceso irreversible en el que las células están destinadas a la diferenciación a alguno de los linajes cardíacos. Esta determinación, en aves ya ha sucedido durante la etapa de gastrulación (St4-St5) (Montgomery y cols., 1994; Antin y cols., 1994). En la diferenciación de las células del mesodermo para dar lugar a células cardíacas están implicadas interacciones entre las tres capas embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo.

Las señales inductivas de cardiogénesis se generan en el mesodermo y/o endodermo antero-lateral. Mediante experimentos de explantes en embriones de ratón (Tam y cols., 1997) y de pollo (Inagaki y cols., 1993) comprobaron que las células de las regiones caudales de la línea primitiva, transplantadas a la región antero-lateral (región precardiogénica) daban lugar a cardiomiocitos, en lugar de células sanguíneas (su destino natural). Sin embargo, el grado de implicación que se ha asignado al mesodermo y al endodermo antero-lateral en la inducción de la cardiogénesis depende de la especie y de la aproximación experimental realizada.

Utilizando experimentos de co-cultivo en embriones de pollo se ha demostrado que las señales inductivas del corazón proceden del endodermo anterior, y no del mesodermo precardiogénico (Schultheiss y cols., 1995; Yatskievych y cols., 1997). En anfibios, la eliminación del endodermo bloquea la formación del corazón (Jacobson, 1960; Nascone y Mercola, 1995). Sin embargo, la ablación genética en embrión de pez

cebra (Alexander y cols., 1999), o la ablación quirúrgica del endodermo en embrión de pollo (Gannon y Bader, 1995) no bloquea la cardiogénesis.

El ectodermo induce la cardiogénesis al interactuar con las señales negativas provenientes de la placa neural (Jacobson, 1960).

Dentro de las señales inductivas de cardiogénesis se encuentran las BMP, los FGF, el ácido retinóico, y la neuregulina1. Los factores Wnt actúan como inductores o inhibidores dependiendo del momento del desarrollo.

7.1.-BMP.

Las BMP pertenecen a la superfamilia de TGF β . De los 20 miembros identificados son la BMP2 y la BMP4 a las que se les ha asignado una función en la diferenciación cardíaca. BMP2 es detectada por PCR en células del endodermo antero-lateral de St6 de pollo (Lough y cols., 1996). Sin embargo, BMP2 por sí sola no induce la diferenciación del mesodermo precardiogénico de St6, necesita de la cooperación con FGF para mimetizar el efecto inductor del endodermo lateral anterior (Lough y cols., 1996).

De forma ectópica BMP2 induce la expresión de marcadores cardíacos como Nkx2.5, GATA4 (Schulteiss y cols., 1997; Andree y cols., 1998) y Tbx2 (Yamada y cols., 2000).

BMP2 y BMP4 inducen la expresión de marcadores cardíacos en mesodermo antero-medial, no precardiogénico, de embriones de pollo en gastrulación (Schulteiss y cols., 1997), y necesitan de la cooperación con FGF4 para inducir la diferenciación cardíaca en el mesodermo posterior (Ladd y cols., 1998; Barron y cols., 2000).

7.2.-FGF.

Los FGF son una extensa familia de proteínas que regulan la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario.

La expresión de FGF8 ha sido detectada en el endodermo antero-lateral de St6 de pollo (Parlow y cols., 1991) y en el endodermo visceral de embrión de ratón de E6,25, equivalente al endodermo antero-lateral de pollo. En estadios posteriores, el FGF8 es detectado en embrión de ratón en el endodermo definitivo, así como en el mesodermo precardiogénico adyacente (Crossley y Martin, 1995).

Tanto en embrión de pollo como de ratón, el FGF8 actúa en la inducción del mesodermo precardiogénico en cooperación con la BMP2. Además, en embrión de ratón, el FGF8 está implicado en la inducción del CCS (Brown y cols., 2004; Ilagan y cols., 2006).

7.3.-Wnt.

Los miembros de la familia de glucoproteínas Wnt son factores excretados a la matriz extracelular. Los factores Wnt activan o inhiben la cardiogénesis dependiendo del factor y del momento del desarrollo embrionario (Naito y cols., 2006). Tres factores Wnt han sido ampliamente estudiados por su implicación en el desarrollo cardíaco: Wnt3a, Wnt8c y Wnt11.

Wnt3a y Wnt8c se expresan en la línea primitiva de embrión de pollo durante la gastrulación (Marvin y cols., 2001). Wnt3a y Wnt8c señalizan a través de la vía Wnt/ β -catenina. La activación de la vía Wnt/ β -catenina promueve la diferenciación del mesodermo hacia el linaje cardíaco en las primeras fases de la cardiogénesis (Naito y cols., 2006), inhibiendo la diferenciación a células cardíacas en etapas más avanzadas de la cardiogénesis (Scheider y Mercola, 2001; Marvin y cols., 2001).

Wnt11 se expresa de forma predominante en el mesodermo precardiogénico de embriones de *Xenopus* (Pandur y cols., 2002) y activa la cardiogénesis a través de la vía Wnt/JNK.

7.4.-Ácido retinóico (AR).

El AR es un morfógeno derivado de la vitamina A y está implicado en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario.

El ratón nulo para *RALDH2*, enzima necesaria para la síntesis de AR presenta disminución del tamaño auricular, así como del polo venoso (Niederreither y cols., 2001). Recientemente, Ryckebusch y colaboradores (2008) han mostrado que en este ratón hay una expansión caudal de la expresión de los marcadores moleculares del CCS: *Isl1*, *FGF8* y *Tbx1*. Los progenitores del CCS del ratón nulo no se diferencian correctamente en cultivo.

Por otro lado, el ratón nulo para *RXR alfa*, un receptor para AR, presenta pérdida de proliferación de los cardiomiocitos ventriculares de la región compacta y disminución del miocardio trabecular (Sucov y cols., 1994; Gruber y cols., 1996).

En embriones de pollo en cultivo, el AR provoca la expansión del patrón de expresión de *Tbx5* y *GATA4* (Liberatore y cols., 2000), expandiendo el dominio auricular a la región ventricular.

7.5.-Neuregulina1 (NRG1).

Las neuregulinas son ligandos que median la interacción célula-célula a través de receptores de la familia ErbB.

En el ratón nulo de los genes *NRG1*, *ErbB2* o *ErbB4*, se produce la pérdida de trabeculación en la curvatura externa del asa cardíaca, destinada a formar los ventrículos

(Meyer y Birchmeier, 1995; Kramer y cols., 1996; Gassmann y cols., 1995; Lee y cols., 1995).

8.-Factores de transcripción implicados en el desarrollo embrionario del corazón.

Los múltiples factores de transcripción implicados en el desarrollo cardíaco se encuentran distribuidos principalmente en cuatro grandes familias: *Nkx2.X*, *Tbx*, *GATA* e *Irx*.

8.1.-Familia *Nkx2.X*

Los *Nkx2.X* son genes homeóticos que comparten el dominio *Nk2*. En vertebrados, se han descrito 10 genes *Nkx2.X*, de los cuales a la mitad de ellos se les ha atribuido alguna función durante el desarrollo embrionario del corazón; *Nkx2.3*, *Nkx2.5*, *Nkx2.6*, *Nkx2.7*.

El gen *Nkx2.3* se expresa en células del mesodermo precardiogénico de embrión de estadio NF 13 de *Xenopus* (Evans y cols., 1995) y en corazón de St18 de pollo (Buchberger y cols., 1996).

El gen *Nkx2.5* se expresa desde gastrulación en endodermo y mesodermo de *Xenopus*, pollo y ratón (Schultheiss y cols., 1995; Tonissen y cols., 1994; Lints y cols., 1993; Tanaka y cols., 1998) y es el primer marcador de diferenciación cardíaca en *Drosophila*, *Xenopus*, pez cebra, pollo y ratón (Azpiazu y Frasch, 1993; Schultheiss y cols., 1995; Chen y Fishman, 1996; Tonissen y cols., 1994; Tanaka y cols., 1998). En pollo la expresión de *Nkx2.5* es detectada desde St5 en la *Hfr* (Schultheiss y cols., 1995) y en ratón desde E7,5 en los primordios cardíacos (Komuro e Izumo, 1993; Lints y cols., 1993).

Nkx2.6 se expresa en corazón de ratón desde E8,5 (Biben y cols., 1998).

La expresión de *Nkx2.7* se detecta en el endodermo faríngeo y el mesodermo precardiogénico de embriones de pez cebra desde las 10 hpf (Lee y cols., 1996).

De los cuatro genes *Nkx2.X* que se expresan en regiones cardiogénicas, es a *Nkx2.5* al que se le ha atribuido un papel más relevante en la cardiogénesis. *Tinman*, el ortólogo de *Nkx2.5* en *Drosophila* es requerido para la formación del vaso dorsal y para la especificación de los progenitores celulares que lo forman (Azpiazu y Frasch, 1993; Bodmer, 1993). El ratón nulo de *Nkx2.5*, a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila*, sí llega a formar el tubo cardíaco, pero muere entre E9 y E10, presentando defectos morfogénicos en la formación del tubo cardíaco y falta de los cojinetes endocárdicos (Lyons y cols., 1995).

El análisis del ratón nulo y del pez cebra tratado con morfolinós muestra que *Nkx2.5* actúa a dos niveles. En primer lugar controla la proliferación o diferenciación de las células auriculares, como se muestra por el exceso de células encontradas en la región auricular del ratón nulo de *Nkx2.5* (Prall y cols., 2007), y en embriones de pez cebra tratados con morfolinós contra *Nkx2.5* (Targoff y cols., 2008). Por otro lado,

Nkx2.5 también controla la contribución celular en la formación ventricular. En el ratón nulo de *Nkx2.5*, las células del CCS son incapaces de llegar al ventrículo (Prall y cols., 2007), y en los embriones de pez cebra tratados con morfolinós aparece un número inferior de células en el ventrículo, con respecto a los controles (Targoff y cols., 2008).

Se ha postulado que el fenotipo menos severo observado en mutantes de *Nkx2.5* en vertebrados respecto a *Drosophila* puede deberse a la redundancia de función del subgrupo de genes *Nkx2.X* expresado en corazón. A favor de la redundancia de función de los factores *Nkx2.X* están los experimentos realizados en *Xenopus*. En embriones de *Xenopus* se bloqueó la diferenciación cardíaca mediante el uso de dominantes negativos contra *Nkx2.3* y *Nkx2.5* (Fu y cols., 1998) o utilizando proteínas *Nkx2.3* y *Nkx2.5* truncadas (Grow y Krieg, 1998). Este bloqueo se revirtió al sobreexpresar cualquiera de los dos factores de transcripción. En contra de la redundancia de función están los modelos genéticos de ratón. Por el patrón de expresión, *Nkx2.6* podría estar compensando la falta de *Nkx2.5*, sin embargo, el ratón nulo de *Nkx2.6* no presenta ningún tipo de alteración cardíaca y muere en edad postnatal (Tanaka y cols., 2000). El doble nulo de *Nkx2.5/Nkx2.6*, presenta un fenotipo muy similar al nulo de *Nkx2.5*: letal embrionario antes de E11 y retraso en la diferenciación de cardiomiocitos de la aurícula (Tanaka y cols., 2001).

En ratón se ha descrito que *Nkx2.5* es haploinsuficiente, presentando los ratones heterocigotos dismorfogénesis valvular y en septación cardíaca (Biben y cols., 2000). En humanos, *Nkx2.5* también es haploinsuficiente, y se han encontrado mutaciones que producen pérdida de función que conducen a enfermedades cardíacas congénitas que llegan a interrumpir la septación del corazón (Schott y cols., 1998) (**Tabla 2**).

En pez cebra, *Nkx2.5* coopera con *Nkx2.7*. Tanto el bloqueo de *Nkx2.5* como el bloqueo de *Nkx2.7* impiden la formación del asa cardíaca (Targoff y cols., 2008).

8.2.-Familia GATA.

Los factores de transcripción GATA están representados en vertebrados por 6 miembros (GATA1 a GATA6).

Gata4/5/6 se expresan en tejidos mesodérmicos y endodérmicos (Molkentin, 2000). Algunos miembros de esta familia se expresan coincidentemente con *Nkx2.5*. En embrión de pez cebra de 10 somitas (<24 hpf) la expresión de *Gata4* coincide con la expresión de *Nkx2.5* en células precardiogénicas (Serbedzija y cols., 1998). En embrión de pollo desde St7, el gen *Gata5* presenta el mismo patrón de expresión en mesodermo precardiogénico que *Nkx2.5* (Laverriere y cols., 1994). En *Xenopus*, los genes *Gata4*, *Gata5* y *Gata6* presentan un patrón de expresión similar y coincidente con el de *Nkx2.5* en el mesodermo precardiogénico de embriones de NF 22, así como en el corazón de embriones de NF 30 (Jiang y Evans 1996).

En *Drosophila*, se ha demostrado la coexpresión de *pannier* (ortólogo de los genes *Gata*) y *tinman*, así como su capacidad de formar heterodímeros (Gajewski y cols., 1999). En vertebrados, también ha sido demostrada la interacción entre GATA4 y Nkx2.5, mediando la regulación transcripcional de genes cardíacos (Shiojima y cols., 1999) así como la regulación transcripcional cruzada entre genes *Gata* y *Nkx* (Davis y cols., 2000).

En *Drosophila*, el nulo de *pannier*, presenta pérdida de cardiomiocitos. El ratón nulo para *Gata4* (Kuo y cols., 1997; Molkentin y cols., 1997), el nulo de pez cebra para *Gata5* (Reiter y cols., 1999), así como la triple regulación a la baja (*knock-down*) de *Gata4/5/6* en pollo (Jiang y cols., 1998), producen defectos cardíacos tales como la falta de fusión de los primordios cardíacos bilaterales, disminución de la expresión de Nkx2.5, y reducción del número de cardiomiocitos.

Los genes *Gata*, de la misma forma que los *Nkx*, tienen funciones redundantes, como ocurre para *Gata4* y *Gata6* en la diferenciación de cardiomiocitos de ratón (Zhao y cols., 2008), o para *Gata5* y *Gata6* en la determinación del linaje cardíaco en pez cebra (Holtzinger y Evans, 2007).

Además, *Gata4* en humanos también es haploinsuficiente, como revelan las mutaciones “sin sentido” (*missense*), o de cambio de fase (*frame-shift*) encontradas en pacientes con enfermedades cardíacas congénitas (Garg y cols., 2003) (**Tabla 2**).

8.3.-Familia Tbx.

De los 18 genes *Tbx* presentes en vertebrados (Papaioannou, 2001), 6 han sido descritos como implicados en el desarrollo embrionario del corazón: *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5*, *Tbx18* y *Tbx20*.

Los genes *Tbx* que se expresan en corazón se dividen en dos subfamilias, *Tbx1* y *Tbx2*. La subfamilia *Tbx2*, que incluye *Tbx2*, *Tbx3* y *Tbx5*, se puede subdividir a su vez, en activadores y represores. De esta forma, se ha comprobado que *Tbx2* y *Tbx3*, pertenecerían a la subdivisión de represores, al reprimir ambos la expresión de los genes *Nppa* y *Cx40* (Habets y cols., 2002; Hoogaars y cols., 2004). Por el contrario, *Tbx5* activa la expresión de *Nppa* y *Cx43* (Bruneau y cols., 2001 (referencia 28)).

El gen *Tbx1* se expresa en cardiomiocitos y células endoteliales del tracto de salida del corazón de ratón desde E9 (Yamagishi y cols., 2003; Brown y cols., 2004; Xu y cols., 2004).

Tbx1 presenta dos funciones en la formación del tracto de salida. Por un lado, tiene un papel en determinar el número de células (cardiomiocitos y células endoteliales) que contribuyen a la formación del tracto de salida, regulando la proliferación de las células del CCS, posiblemente vía FGF10. Por otro lado, las células que expresan *Tbx1* también contribuyen a la formación del septo aorto-pulmonar (entre

las arterias aorta y pulmonar) (Xu y cols., 2004). El gen *Tbx1* es haploinsuficiente, dando lugar en humanos al Síndrome de DiGeorge, con anomalías en el tracto de salida del corazón, así como en los arcos faríngeos (Baldini, 2004) (**Tabla 2**).

Los genes *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5* y *Tbx20*, inicialmente comparten los territorios de expresión en los primordios cardíacos de embriones de pollo (Yamada y cols., 2000; Iio y cols., 2001).

Tbx2 se expresa en el miocardio del canal atrio-ventricular adyacente a las válvulas tricúspide y mitral, así como en el septo auricular en el corazón tetracamérico de pollo de E6 (Plageman y Yutzey, 2005).

Tbx3 se expresa en el nodo sinoauricular de corazones de embriones y de ratones adultos (Stieber y cols., 2004).

Los ratones nulos para el gen *Tbx3* indican que éste está implicado en la especificación de la región sinoauricular inhibiendo la expresión de genes del miocardio auricular y activando la expresión de genes específicos del nodo sinoauricular. La expresión de *Tbx3* en la región auricular da lugar a la aparición de marcapasos ectópicos (Hoogaars y cols., 2007).

Tbx5 se expresa en los primordios bilaterales del corazón de *Xenopus* y pez cebra (Chapman y cols., 1996) y en las crestas cardíacas de ratón (Plageman y Yutzey, 2004). En el corazón tetracamérico de E6 de pollo, y E13,5 de ratón, *Tbx5* se expresa en la región auricular, ventrículo izquierdo y septo interventricular (Plageman y Yutzey, 2005; Bruneau y cols., 1999).

Tbx5 ha sido implicado en la proliferación de cardiomiocitos (Hatcher y cols., 2001), y en la migración de las células del proepicardio (Hatcher y cols., 2004). El ratón nulo para *Tbx5* (Bruneau y cols., 2001 (referencia 28)), y los embriones de *Xenopus* tratados con dominantes negativos de *Tbx5* (Horb y Thomsen, 1999) presentan alteraciones en la estructura sinoauricular y disminución de la expresión de *Nkx2.5*. En el ratón nulo de *Tbx5*, además se inhibe la expresión de otros factores de transcripción como *GATA4* e *Irx4*. Por otro lado, la sobreexpresión de *Tbx5* en la región ventricular, produce morfogénesis ventricular aberrante (Liberatore y cols., 2000). El gen *Tbx5* también es haploinsuficiente, encontrándose mutaciones en humanos que dan lugar al Síndrome de Holt-Oram (SHO) (Basson y cols., 1997) (**Tabla 2**). Este síndrome se caracteriza por la aparición de defectos en la septación auricular, y problemas en el sistema de conducción cardíaco. Recientemente se ha mostrado que en el SHO la haploinsuficiencia de *Tbx5* provoca problemas en la función diastólica del corazón, alterando la relajación de los cardiomiocitos ventriculares (Zhu y cols., 2008).

Mediante ensayo de doble híbrido se ha demostrado la interacción física de *Tbx5* y *Nkx2.5* (Hiroi y cols., 2001).

El gen *Tbx18* en ratón, pollo y pez cebra se expresa en el proepicardio (Kraus y cols., 2001; Begemann y cols., 2002; Tanaka y Tickle, 2004). Las células del proepicardio dan lugar a células mesenquimales que migran y forman el epicardio (Virág y Challice, 1981), y a la vasculatura coronaria (Pérez-Pomares y cols., 2002). En ratón y en pollo, la expresión de *Tbx18* se mantiene en el epicardio (Kraus y cols., 2001; Plageman y Yutzey, 2005).

El ratón nulo de *Tbx18* es viable hasta el nacimiento (Bussen y cols., 2004), mientras que los ratones que tienen fallos en el desarrollo del epicardio no sobreviven más allá de E15 (Chen y cols., 2002). Esto indica que aunque *Tbx18* esté involucrado en el desarrollo del epicardio, no es imprescindible.

Tbx20 se expresa en las dos aurículas y en los primordios de las válvulas tricúspide y mitral en el corazón de pollo de E6 (Plageman y Yutzey, 2005).

8.4.-Familia Irx.

La familia *Irx* son genes homeóticos, representados en vertebrados por 6 miembros (*Irx1-Irx6*) que comparten un dominio de 13 aminoácidos denominado *Iro box* (Gómez-Skarmeta y Modolell, 2002). Los genes *Irx1/2/4/5* presentan expresión en el corazón (Christoffels y cols., 2000; Bruneau y cols., 2001 (referencia 25)), pero hasta el momento solo han sido atribuidas funciones cardíacas a los genes *Irx4* e *Irx5*.

La expresión del gen *Irx4* es detectada desde E8,5 en ratón (Bruneau y cols., 2000) y desde St10 en pollo (Bao y cols., 1999), en ambos casos restringida a la región ventricular. Su expresión ventricular se mantiene a lo largo del desarrollo.

La sobreexpresión de *Irx4* en pollo, mediante la utilización de vectores virales, induce la expansión de marcadores ventriculares a la región auricular, y la disminución de la expresión de genes auriculares. El bloqueo de *Irx4* utilizando dominantes negativos, produce el efecto contrario, es decir, se expande la expresión de marcadores auriculares a la región ventricular, disminuyendo la expresión de marcadores ventriculares (Bao y cols., 1999). Los ratones nulos para *Irx4* poseen una morfología cardíaca normal, pero desarrollan durante la edad adulta hipertrofia cardíaca, y defectos en la función contráctil. Estas cardiomiopatías vienen precedidas de un patrón de expresión alterado de los genes del ventrículo (Bruneau y cols., 2001).

La expresión del gen *Irx5* se detecta desde E9,5 (Bruneau y cols., 2000), indistintamente en aurícula y ventrículo.

El ratón nulo de *Irx5* no presenta problemas de supervivencia embrionaria, y es completamente fértil. Sin embargo, estos ratones tienen problemas en la repolarización cardíaca (Costantini y cols., 2005).

Tabla 2.-Genes implicados en el desarrollo embrionario del corazón, y defectos producidos por su ausencia.

	Defectos cardíacos	Síndrome en humanos
Nkx2.5	septación auricular y ventricular, sistema de conducción	
Hand1	ventrículo izquierdo	
Hand2	ventrículo derecho anómalo	
GATA4	septación auricular y ventricular	
Tbx1	tracto de salida	Di George
Tbx3	nodo sinoauricular	
Tbx5	septación auricular y ventricular, sistema de conducción	Holt-Oram
Tbx20	no formación de cámaras, no formación tracto salida	
Fgf8	tracto de salida	
Fgf10	No muestra	
Isl1	aurícula y ventrículo único, no tracto de salida	
Pitx2c	polo venoso	

II.-OBJETIVOS

La **hipótesis general** de este trabajo es que las catecolaminas se expresan y actúan como moléculas reguladoras durante el desarrollo embrionario y, específicamente, están implicadas en el desarrollo embrionario del corazón.

El **objetivo global** de esta Tesis es la caracterización de los transcritos quimera generados a partir de los genes de la *tirosina hidroxilasa* (TH) e *insulina* (TH-INS1 y TH-INS2), determinar el patrón de expresión de la TH, y definir la función de la L-DOPA y la dopamina en las primeras etapas del desarrollo cardíaco.

Como **objetivos concretos** abordamos:

Objetivo 1: El análisis de la estructura de los transcritos quimera TH-INS1 y TH-INS2 así como de la actividad de las proteínas generadas a partir de éstos.

Objetivo 2: La caracterización del patrón de expresión y la actividad de la TH durante los primeros estadios del desarrollo embrionario de pollo. Implicación de la L-DOPA y de la dopamina durante las primeras fases del desarrollo embrionario del corazón de pollo.

Objetivo 3: Determinar la presencia de TH en estadios embrionarios de otras especies: ratón y *Xenopus laevis*.

Objetivo 4: Valorar el efecto de la L-DOPA y de la dopamina sobre la diferenciación de células troncales a cardiomiocitos.

III.-MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Animales de experimentación.

Los embriones de pollo (*Gallus gallus*) (**Fig. 6A**) se obtuvieron tras la incubación de huevos fertilizados a 38°C y 60-80% de humedad relativa. Se utilizaron embriones de la raza *Isa Brown* (Granja Santa Isabel, Córdoba, España), salvo en los experimentos de los transcritos de tirosina hidroxilasa (TH), en los cuales se utilizaron embriones de la raza *White Leghorn* (Granja Rodríguez-Serrano, Alba de Tormes, Salamanca, España). Los embriones se estadiaron conforme a lo establecido por Hamburger y Hamilton (1951).

Los huevos fertilizados de codorniz (*Coturnix coturnix*) fueron cedidos amablemente por el Dr. Virgilio García Martínez de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura. Se incubaron y estadiaron de la misma forma que los de pollo.

Los ratones silvestres que se utilizaron en este estudio, así como los *THKO* (del inglés *Tyrosine Hydroxylase Knock Out*) eran de la estirpe C57/BL6. Los ratones *TH+/-* (heterocigotos para el gen *TH*) fueron cedidos amablemente por el Dr. Richard D. Palmiter de la Universidad de Washington (Seattle, EEUU). Todos los animales se mantuvieron en el Centro de Investigaciones Biológicas en ciclos de 12 horas de luz, 12 de oscuridad a una temperatura de 20°C con comida y bebida *ad libitum*. La manipulación de los mismos se realizó conforme a la normativa vigente en la Unión Europea.

Los embriones de *Xenopus* (*Xenopus laevis*) (**Fig. 6C**) fueron cedidos amablemente por las Dras. Ana Isabel Valenciano y María Jesús Delgado de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Se estadiaron según lo descrito por Nieuwkoop y Faber (1956).

2.-Cultivo *EC* (del inglés *Early Chick*) para embriones de pollo.

El cultivo *EC*, es una variante del cultivo de New, descrito por Chapman y colaboradores (2001).

El huevo se abrió utilizando unas pinzas con punta roma. Se eliminó la clara más densa, y la yema se vertió en una placa Petri. Dicha yema se pasó de una placa Petri a otra hasta conseguir que el embrión quedase centrado en la superficie de la yema. Los restos de clara que rodeaban al embrión se eliminaron utilizando pañuelos de papel. Sobre el embrión se colocó un aro de papel de filtro (cuadrado de papel de filtro de 20 mm X 20 mm (Whatman, EEUU), que poseía cuatro perforaciones en su interior, formando un dibujo que asemejaba a un trébol de cuatro hojas. Se recortó la membrana vitelina alrededor de dicho cuadrado de papel con unas tijeras con punta angular. Se levantó el aro de papel, procurando que el embrión no se desprendiese del mismo. Para ello, el aro se sujetó con

unas pinzas y se levantó oblicuamente, facilitando así que los restos de yema no quedasen adheridos al embrión. El embrión adherido al arito de papel de filtro, se colocó con la parte ventral hacia arriba, sobre una placa de 35 mm de diámetro que contenía el medio de cultivo semisólido. Este medio estaba compuesto por una mezcla de 50% de 123 mM NaCl con 0,6% de agar (Pronadisa, Madrid, España) y 50% de ovoalbúmina extraída de huevos no incubados.

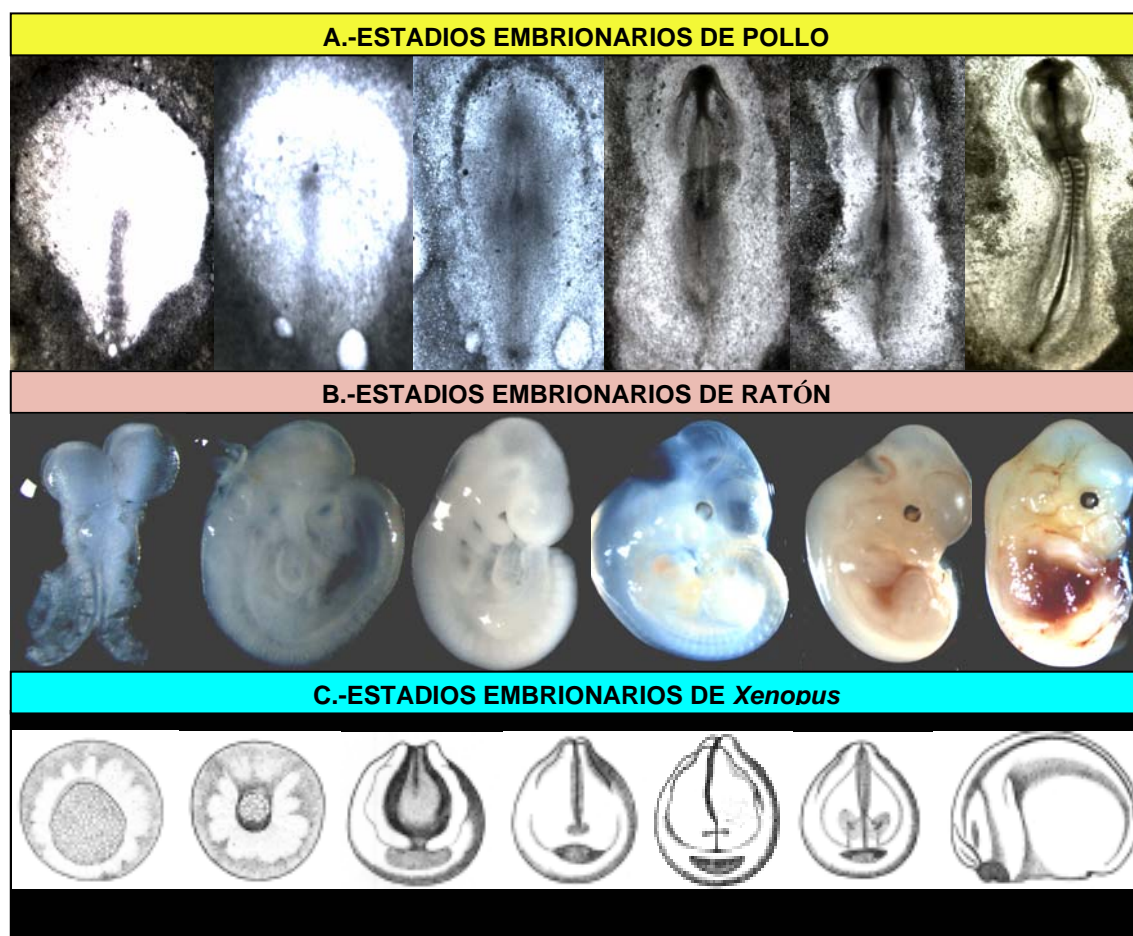


Figura 6.-Estadios embrionarios más representativos de las especies utilizadas a lo largo de la Tesis.

(A) De izquierda a derecha se muestran fotos de embriones de pollo de St3, St4, St5, St8, St8 y St10 (vista ventral en todos ellos).

(B) De izquierda a derecha se muestran fotos de embriones de ratón de E8,5 (vista ventral); E9,5; E10,5; E11,5; E12,5 y E13,5 (E9,5-E13,5, vista lateral).

(C) De izquierda a derecha se muestran dibujos de embriones de *Xenopus* extraídos de www.xenbase.org/xenbase/original. Se muestran: NF 10 (vista anterior), NF 12 (vista del polo vegetativo), NF 15, NF 19, NF 20, NF 21 (NF 15-NF 21, vista anterior), NF 22 (vista lateral).

3.-Implantación de microesferas acrílicas de heparina.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Carmen López Sánchez de la Universidad de Extremadura.

Las microesferas acrílicas de heparina (Sigma, St Louis, MO, EEUU), son usadas habitualmente en biología del desarrollo por su capacidad de adherir a su superficie diferentes sustancias tales como ácido retinóico, factores de crecimiento (FGFs, etc). El tipo de unión o adhesión de dichas moléculas, así como la forma de liberación de las mismas se desconoce. Estas microesferas son útiles para ver el efecto local de la sustancia de interés en una región determinada del embrión.

Las microesferas se seleccionaron en función del tamaño, utilizándose en nuestro estudio aquellas que poseían 100-150 μm de diámetro. Estas microesferas se incubaron durante al menos 2 horas a 4°C, en una gota que contenía la sustancia objeto de estudio a la concentración deseada. Como control de la L-DOPA y de la dopamina se usaron microesferas incubadas en PBS (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Como control de la 3-I-Tyr (del inglés *3-Iodo-Tyrosine*) (Sigma), un inhibidor de la tirosina hidroxilasa, así como de la 3-hidroxibenzilhidrazina (mHBH) (Sigma), inhibidor de la aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), se usaron microesferas incubadas en HCl, al ser éste utilizado para la disolución de la droga.

Las microesferas se implantaron en los embriones de estadios y posiciones descritas en el capítulo de Resultados (apartados 12, 13 y 14). Para ello, se colocaron los embriones en cultivo *EC* (descrito en el apartado 2), con la parte ventral hacia arriba. Se realizó una pequeña incisión en el endodermo del embrión en la posición deseada, utilizando para ello espinas de cactus. Las microesferas se depositaron dentro de la incisión con unas pinzas y utilizando de nuevo una espina de cactus, se implantaron en la cavidad existente entre el endodermo y el ectodermo embrionario.

Una vez implantada la microesfera, los embriones se incubaron a 38°C y 60-80% de humedad relativa por el tiempo indicado. Transcurrido el tiempo, los embriones se fijaron en 4% PFA en PBS-DEPC (PBS, 0,1% dietilpirocarbonato) y se procesaron para hibridación *in situ* o inmuohistoquímica.

4.-Electroporación.

Los embriones se extrajeron del huevo con aritos de papel de filtro y se colocaron en cultivo *EC* (apartado 2). Se eligieron aquellos cuyos estadios embrionarios estaban entre St3 y St3+. Dichos embriones se colocaron con la parte ventral hacia

arriba, sobre una placa que contenía el electrodo negativo de platino (CUY701P2E) (Sonidel, Dublín, Irlanda). Se inyectó el plásmido (ver más abajo) o morfolino (Gene Tools, OR, EEUU) de interés en la región de la línea primitiva en la que los precursores cardíacos están migrando (**Fig. 7A**) (García-Martínez y Schoenwolf, 1993). Para ello se utilizó un microinyector INJECT+MATIC (J.A.Gavy, Inject Matic, Ginebra, Suiza) y capilares de borosilicato (World Precision Instruments, Florida, EEUU). El electrodo positivo de platino (CUY613P2) (Sonidel) se colocó rápidamente sobre la zona de inyección, y se electroporó utilizando un electroporador *TSS20 Ovodyne Electroporator* (Intracel, Reino Unido) de onda cuadrada. Las condiciones de electroporación fueron: 5 mV, 5 pulsos, 40 milisegundos/pulso, con un intervalo de 990 milisegundos entre pulsos.

Para preparar la solución de electroporación se utilizó 0,1% de *Fast Green* (Sigma) para los plásmidos o azul de metileno para los morfolinos como marcadores de la zona de inyección (**Fig. 7B**).

Para la sobreexpresión del cDNA de la tirosina hidroxilasa de pollo (cTH, del inglés *chicken Tyrosine Hydroxylase*) se realizaron dos aproximaciones: 1) coelectroporación de pCAGGS y pCX-EGFP (cedidos por la Dra. Aixa Morales); 2) electroporación del vector bicistrónico pCAGGS-STOP-IRES-GFP (los vectores se describen en el apartado 15). En la coelectroporación se usaron 3 µg/µl de pCAGGS (control) o pCAGGS-cTH y 1 µg/µl de pCX-EGFP. En la electroporación con el plásmido bicistrónico se usó una concentración de 3 µg/µl pCAGGS-STOP-IRES-GFP (control) o pCAGGS-cTH-STOP-IRES-GFP.

Para el bloqueo de la expresión de cTH se electroporó un morfolino dirigido contra la región 5' no traducida e inicio de la traducción del mRNA de cTH (P14) (**Tabla 4**). Como control se utilizó un morfolino contra el mRNA de luciferasa (Gene Tools).

En los embriones electroporados se realizó un seguimiento bajo la lupa de fluorescencia (Leica, Westland, Alemania), de la migración de las células electroporadas, por la expresión de la GFP en el caso de los plásmidos o bien por la 3' carboxifluoresceína presente en los morfolinos. Los embriones se fijaron en 4% PFA en PBS en los estadios indicados y se procesaron para inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

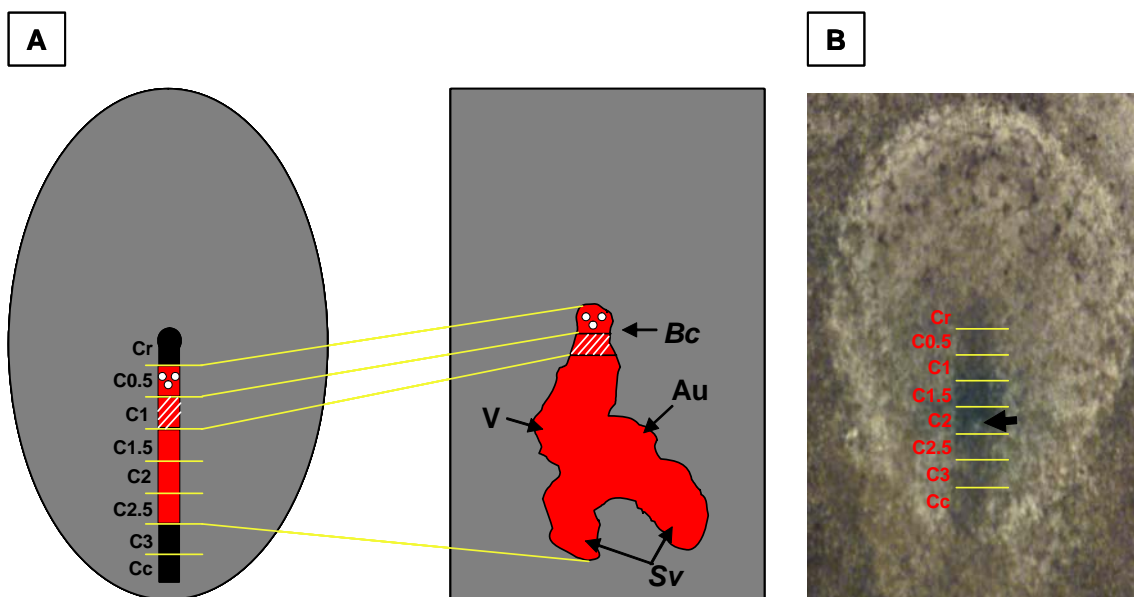


Figura 7.-Regionalización de la línea primitiva en St3-St3+.

(A) García-Martínez y Schoenwolf (1993) dividieron la línea primitiva en ocho regiones de 125 μ m cada una (Cr, C0.5, C1, C1.5, C2, C2.5, C3 y Cc). Las regiones C0.5 y C1 originan el *Bulbus cordis* (Bc). La región auricular (Au), ventricular (V) y polo venoso (Sv, *Sinus venosus*) se forman a partir de las regiones C1.5-C2.5. El dibujo de la izquierda muestra la regionalización de la línea primitiva de St3. En el dibujo de la derecha se representa un corazón en asa cardíaca de St11, así como el origen de las diferentes regiones del mismo.

(B) Foto de embrión de St3+ en la que se muestra la regionalización de la línea primitiva. Este embrión ha sido electroporado, tras la inyección del vector bicistrónico en la región C2 (flecha negra). Alrededor del lugar de inyección se ven restos del *Fast Green* utilizados para indicar el área de inyección.

5.-Cultivo de líneas celulares inmortalizadas.

La línea de fibroblastos de ratón NIH3T3, así como la línea de riñón embrionario humano HEK293T (del inglés *Human Endothelial Kidney with SV40 large T antigen*) se cultivaron en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de FBS (del inglés *Fetal Bovine Serum*), 2 mM de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina (todo de Gibco, Carlsbad, CA, EEUU).

La línea celular PC12 (feocromocitoma de rata) se cultivó en DMEM suplementado con 10% HS (del inglés *Horse Serum*), 5% FBS y 1% penicilina/estreptomicina (todo de Gibco).

Estas líneas celulares se crecieron a 37 °C y 5% de CO₂.

6.-Transfecciones celulares.

Generalmente las transfecciones de plásmidos se realizaron cuando se alcanzó un 60%-80% de confluencia celular. Las células NIH3T3, HEK 293T y PC12 se transfectaron

mediante el reactivo Lipofectamine™ Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cDNA de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2 (transcritos quimera de la tirosina hidroxilasa e insulina) (apartado 15.1), se transfectaron en el vector de expresión de mamíferos pCIneo (Promega, EEUU). Las células se transfectaron utilizando cantidades similares de ambas construcciones, salvo para el caso de los ensayos de actividad enzimática. En este caso se trató de obtener niveles de proteína cTH y cTH-INS1 similares, modificando los niveles de cada construcción utilizados para la transfección. Para que los niveles de DNA utilizados en la transfección fuesen iguales para ambas construcciones, se utilizó el vector vacío, equiparando de esta forma los niveles plasmídicos de partida. Las células se procesaron transcurridas 24 ó 48 horas para extracción de RNA, inmunodetección tipo *Western Blot*, o medida de la L-DOPA.

7.-Cultivo de células troncales de ratón: línea celular E14Tg2a.IV (E14).

Los experimentos con la línea E14Tg2a.IV se realizaron en el Centre for Life de la Universidad de Newcastle (Reino Unido), en el laboratorio de la Dra. Deborah Henderson.

La línea de células troncales embrionarias de ratón E14 se mantuvo en condiciones indiferenciadas cultivándolas en botellas de cultivo de 25 cm² recubiertas de 0,1% gelatina a 37°C de temperatura y 5% CO₂. Para preparar las botellas de cultivo, éstas se incubaron con una solución de 0,1% gelatina (Sigma) en DPBS (Dulbecco PBS) (Invitrogen) a 37°C durante al menos 5 minutos. Transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de gelatina y se dejaron secar en el incubador durante 5 minutos.

Las células se expandieron a una dilución 1:8 cada dos días. Para ello se lavaron con 3 ml de DPBS y se levantaron de la superficie de cultivo incubando con 1 ml 0,05% de tripsina-EDTA (Invitrogen) a 37°C durante 5 minutos. A continuación se detuvo la acción de la tripsina añadiendo 4 ml de medio de proliferación. Las células se centrifugaron a 1000 r.p.m. durante 4 minutos, y el precipitado celular obtenido se resuspendió en medio de proliferación. El medio de proliferación estaba compuesto por DMEM con glutamina, piruvato, 4,5 g/l de glucosa, suplementado con 1% glutamina, 1% aminoácidos no esenciales, 0,1% 2-mercaptoetanol, 1% penicilina/estreptomicina y 10% FBS (especial para células troncales embrionarias) (todo de Invitrogen). El estado indiferenciado se mantuvo añadiendo 10⁶ unidades de ESGRO® LIF (del inglés *Leukaemia Inhibitor Factor*) (Chemicon, Temecula, CA, EEUU) por litro de medio de cultivo (**Tabla 3**).

8.-Diferenciación de las células troncales a cardiomiocitos.

La diferenciación de células troncales embrionarias se logró usando medio de diferenciación y cultivando las células en placas bacteriológicas de 100 mm de diámetro mediante una variación del método de “gota colgante” descrito por Wobus (Wobus y cols., 1991). Dicho procedimiento permitió la agregación de las células troncales embrionarias para formar los denominados cuerpos embrionarios (CE) simples (**Fig. 8**).

8.1.- Disposición de las células en “gotas colgantes”. (Día 0)

Las células indiferenciadas creciendo en medio de proliferación se lavaron con DPBS, se despegaron de la placa de cultivo con tripsina, y se centrifugaron para eliminar la tripsina. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular obtenido se resuspendió en medio de diferenciación. Se realizó un recuento del número de células. Se preparó una suspensión celular de $1,5 \times 10^4$ células/ml en medio de diferenciación. Se sembraron 10-15 ml de la suspensión celular en una placa Petri de bacterias, para evitar que las células se adhiriesen a la superficie de la placa. A partir de esta suspensión celular se sembraron gotas de 20 μ l (300 células/gota) utilizando una pipeta multicanal o repetidora sobre la cara interna de la tapa de una placa de cultivo P100 (10 cm de diámetro) (**Fig. 8B**). En la base de la placa se pusieron aproximadamente 10 ml de DPBS, que servirían para mantener unas condiciones de humedad óptimas, evitando que las gotas se secasen. Se volteó la tapa conteniendo las gotas sobre la base de la placa con cuidado para que éstas no cayeran ni se mezclasen entre sí. Las placas que contenían las gotas colgantes se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante dos días (**Fig. 8A**).

El medio de diferenciación estaba compuesto de DMEM con L-glutamina, piruvato y 4,5 g/l glucosa, 20% FBS (suero de uso regular), 1% glutamina, 1% aminoácidos no esenciales, 0,1% 2-mercaptoetanol (todo de Invitrogen) (ver **Tabla 3**).

8.2.-Recolección de cuerpos embrionarios (CE). (Día 2)

Después de dos días de incubación de las gotas colgantes, las células se habían agregado y habían formando pequeños CE. Las gotas que contenían los CE se recogieron una a una con una pipeta P1000 para evitar dañar las estructuras. Se depositaron en una placa Petri de bacterias, para evitar su adhesión a la superficie de la placa, a la cual se le añadieron previamente 10-12 ml de medio de diferenciación. El número de gotas a depositar sobre cada placa fue variable y dependía del número de CE formados (aproximadamente 50 por placa). Estos CE se cultivaron en suspensión a 37°C y 5% CO₂ durante tres días (**Fig. 8A**).

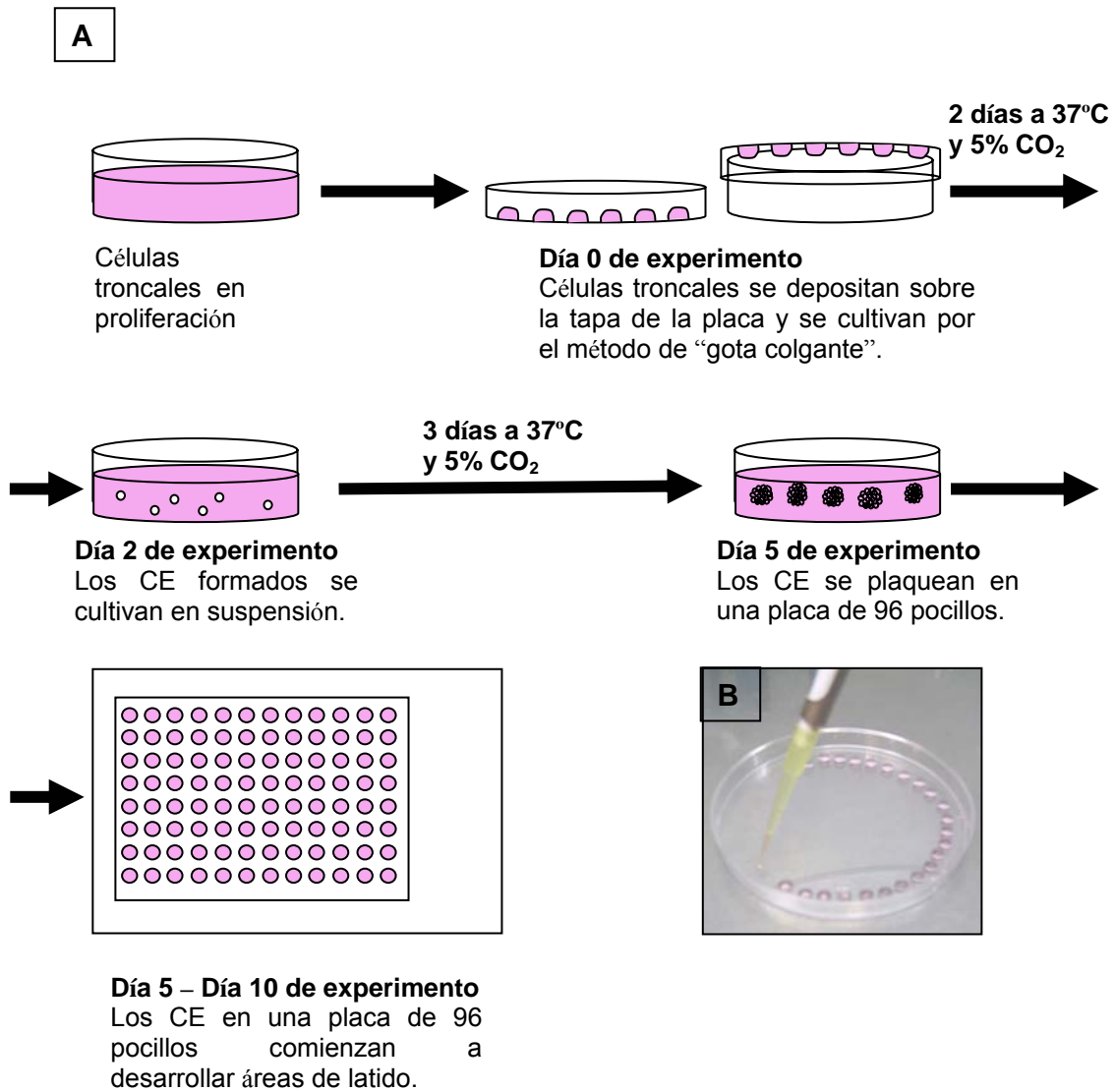


Figura 8.-Diferenciación de las células troncales E14.

(A) Las células E14 en su estado indiferenciado, proliferan sobre una capa de 0,1% gelatina. Para la diferenciación de las células se utiliza el método de “gota colgante”. El día 0 de experimento, las células troncales se disponen en gotas colgantes sobre la tapa de una placa de Petri. El día 2 de experimento los CE formados en las gotas colgantes se transfieren a una placa de Petri, para que las células de los CE continúen proliferando en suspensión. El día 5 de experimento los CE (de mayor tamaño) se plaquean en una placa de 96 pocillos.

(B) Foto en la que se muestra la disposición de las células en gotas colgantes.

8.3.-Siembra de CE en superficie adherente (Día 5).

Pasados tres días, los CE en suspensión habían proliferado y habían adquirido un tamaño fácilmente visible. Los CE se recogieron en el menor volumen posible y se depositaron en una placa que contenía unos 10 ml de medio de diferenciación sin suero. Cada uno de estos CE se recogió con 270 µl de medio de diferenciación sin suero, se sembró en una placa de 96 pocillos (un CE por pocillo) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂.

Transcurridas unas 5 horas, los CE se habían adherido a la superficie de la placa y habían comenzado a expandirse para formar CE císticos. En los CE císticos podían observarse, entre otros tipos celulares, áreas de contracción espontánea, que contenían cardiomiocitos. El período de tiempo transcurrido desde que se sembraron en placa de 96 pocillos hasta que se observaron las áreas de latido fue variable (1-4 días).

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para las células troncales.

	Proliferación E14	Diferenciación E14
DMEM	434 ml	194,75 ml
FBS	50 ml (10%) Especial cél. troncales	50 ml (20%) Suero de uso regular
2-mercapto-etanol (10mM)	0,5 ml (0,1%)	0,25 ml (0,1%)
Aminoácidos no esenciales (100X)	5 ml (1X)	2,5 ml (1X)
Glutamina (200 mM)	5 ml (1%; 2 mM)	2,5 ml (1%; 2 mM)
Penicilina/Estreptomina (10⁴ U/ml)	5 ml (100 U/ml)	
LIF	0,5 ml (10 ⁶ U/ml)	

9.-Tratamiento de las células E14 con L-DOPA y dopamina.

Tanto para la L-DOPA como para la dopamina, se preparó una solución madre de 5 mM en H₂O estéril. Ambas drogas se aplicaron el día 5 de experimento (**Fig. 8A**). A la placa Petri conteniendo 10 ml de medio de diferenciación sin suero, se le añadió L-DOPA o dopamina a una concentración final de 10 µM. A la placa control se le añadió el volumen equivalente de H₂O. Cada día se renovaron 200 de los 270 µl de medio que contenía cada pocillo con medio de diferenciación sin suero conteniendo el tratamiento farmacológico. A los 5 días se juntaron los CE del mismo tratamiento, se les extrajo el RNA y se procesaron para PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*).

10.-Extracción de RNA.

El RNA total se extrajo usando Trizol® (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las soluciones utilizadas se autoclavaron o se prepararon con agua autoclavada 2 veces. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en gel de agarosa.

En los casos en que se disponía de poco material: *Hfr* (del inglés *Heart forming region*), primordios cardíacos, asas cardíacas de pollo y muestras de células troncales, se añadió 1 µl de glucógeno (Invitrogen) a 20 µg/µl, para facilitar la precipitación del RNA.

11.-RT.

Para las reacciones de transcripción reversa (RT, del inglés *Reverse Transcription*) se utilizaron 1-5 µg de RNA total, Oligo dT, y la enzima Superscript III (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cuando las muestras de RT se procesaron para qPCR, la transcripción reversa se realizó con oligonucleótidos sintéticos degenerados p(dN)6 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

12.-PCR.

12.1.-PCR a tiempo final.

Los cebadores utilizados específicamente en cada experimento están referidos a lo largo de Resultados y listados en la **Tabla 4**. Típicamente las reacciones de amplificación se realizaron con 2 µl del producto de RT en un volumen final de 50 µl, y la amplificación se llevó a cabo generalmente con *Taq polymerase* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Cuando el producto de la amplificación iba a ser clonado, se utilizó la enzima *Elongasa* (Invitrogen) o *High Fidelity* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), para minimizar errores introducidos por otras polimerasas. En los casos en que se disponía de poco material de partida, también se utilizó como enzima la *High Fidelity* por su mayor rendimiento. Las condiciones estándar de amplificación fueron: 1 ciclo a 94° C 2 minutos, 35 a 40 ciclos a 94° C 30 segundos, 58° C 30 segundos y 68° C 1 minuto. Para amplificar el cDNA de GAPDH se realizaron entre 20 y 25 ciclos, en condiciones como las descritas.

El resultado de las amplificaciones se analizó en geles de agarosa al 0,8 ó 2% conteniendo bromuro de etidio.

Tabla 4.-Secuencia de cebadores, así como del morfolino contra cTH utilizado en la electroporación.

CEBADOR	SECUENCIAS DEL CEBADOR 5' A 3'	GEN	ESPECIE	CADENA
P1	C A C G A G T G A A G A T G C C A A C	TH	pollo	sentido
P2	G T T A C A G A C T A G G A A C A G G G	TH	pollo	antisentido
P3	G C T A G T T G C A G T A G T T C T C C A G T T	insulina	pollo	antisentido
P4	T G C C T G C A A G G A G T A C C T A G	TH	pollo	sentido
P5	C A C C A T G C C A A C C C C C A A C A	Gtw-TH	pollo	sentido
P6	A A G C T C G T A A C A T G G C G G A C	cTbx5	pollo	sentido
P7	T T A G C T G T T C T C G C T C C A C T	cTbx5	pollo	antisentido
P8	A C A G A A C T C G G G A C C A C C	TH	ratón	sentido
P9	A C A C A T G G G A A A G C C T C T G	TH	ratón	antisentido
P10	A T C C A C A T T C G T G T T G C T G C	TH	ratón	sentido
P11	T T G G A C T C T C A G G A G C C A A C	TH	ratón	antisentido
P12	G C T A T T G G G C G A A G T G C C G G	neomicina		sentido
P13	G G C A A G C A G G C A T C G C C A T G	neomicina		antisentido
P14	G G G T T G G C A T C T T C A C T C T T C C A C G			
P15	G C A G G G C T C C T G T C T T C C T A	TH	pollo	sentido
P16	A C A G C A T C G A G C T C C T G G A C A	TH	pollo	sentido
P17	G C T C T C C A C A C A C C A G G T G A	insulina	pollo	antisentido
P18	C C C T G T T C C T A G T C T G T A A C	TH	pollo	sentido
P19	G G C T G G G A G T C T T T C C A G T G T	TH	ratón	sentido
P20	G G A C C C A C A G A A G C C T G G C A	TH	ratón	antisentido
P21	C A G C A G A G G C A G C A G C A T G	TH	ratón	sentido
P22	G G A G G A C A C A G A C A T T C T T A C	TH	ratón	antisentido
P23	G G A A T G T G T G C G A G G C C A G	neomicina		antisentido
P24	T T G T C A G A T G A G C C A G A G G T	TH	<i>Xenopus</i>	sentido
P25	G C T G A G T T C A G A A C T T C A A T G	TH	<i>Xenopus</i>	antisentido

En esta tabla TH= tirosina hidroxilasa. El morfolino contra TH, P14 presenta resaltadas en rojo las tres bases que hibridan con el codón de inicio de la traducción de la TH de pollo.

12.2.-PCR cuantitativa (qPCR).

La qPCR se realizó mediante dos métodos que variaban en el sistema de detección del producto amplificado:

12.2.1.-Utilización del sistema Oligo LUX™.

Para la detección de los productos de amplificación se utilizó uno de los cebadores de cada pareja marcado con FAM (Invitrogen), fluoróforo que emite fluorescencia sólo cuando está unido al DNA de doble cadena. Los niveles de fluorescencia se detectaron en cada ciclo durante la elongación de los productos, de manera que al final de la reacción se tenía una representación del incremento de fluorescencia por ciclo de PCR. Para cada reacción de qPCR, se utilizó 1 µl del producto de RT, en un volumen final de 25 µl, y el *kit Core* (Invitrogen). Puesto que cada producto amplificado tenía una cinética diferente, fue necesario utilizar una curva estándar para cada uno, por lo que se determinó la cantidad de cada amplicón por extrapolación a la curva. Para las muestras de embrión de pollo, típicamente se utilizó como curva estándar RT de embrión de pollo de St10. Cuando se

analizó la expresión del transcrito cTH-INS1 con respecto al mRNA de cTH e insulina, se utilizó el vector pCIneo que contenía la construcción cTH-INS1 en la que el punto más concentrado contenía 10 picogramos de vector en los 25 µl de reacción y los demás, hasta seis puntos, eran diluciones seriadas 1:10 (hasta 0,0001 picogramos). Como gen normalizador se utilizó la *GAPDH*.

Típicamente, las qPCR se realizaron con 1 µl de RT (10 µl de una dilución 1/10), 1 µl H₂O, 12,5 µl Mix, 0,5 µl de Rox y 0,5 µl de cada uno de los cebadores (concentración madre a 100 µM). La qPCR se realizó en el aparato ABI Prism 7700 (Applied Biosystems).

El Análisis de los datos se realizó con el programa *ABI Prism Sequence Detection System*.

12.2.2.-Utilización del sistema *Universal probe*.

En el segundo sistema de detección de la qPCR, se utilizó *TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG* (Applied Biosystems) y sondas de *The Universal Probe Library* (UPL) (Roche Applied Science) para la detección. Esta reacción se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Típicamente, las qPCR se realizaron con 0,5 µl de RT, 5,4 µl H₂O, 10 µl Master Mix, 0,2 µl de sonda y 0,2 µl de cada uno de los cebadores.

Para el análisis de las células troncales de ratón se utilizó como gen normalizador el *18S rRNA* y como curva estándar RT de RNA de corazón embrionario de 14,5 días.

La qPCR se realizó con el *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

El listado de cebadores utilizados en ambos casos aparece enumerado en la **Tabla 5**.

Tabla 5.-Cebadores utilizados en la qPCR.

SONDA	SECUENCIA DEL CEBADOR 5' - 3'	GEN	ESPECIE	CADENA
16	GTCTGGGGACCTGTCTGC	Nkx2.5	ratón	sentido
	AGTAGGCCTCGGGCTTGA	Nkx2.5	ratón	antisentido
17	GACGACGTGGAGGACGAC	Tbx2	ratón	sentido
	CCAGCTTGTGGAAGTGGTC	Tbx2	ratón	antisentido
9	CGAAGTGGGCACAGAGATG	Tbx5	ratón	sentido
	CACCTTCACTTTGTAAGTAGGAAACA	Tbx5	ratón	antisentido
69	AGGCTCACTTCGAGAACAGG	TT2	ratón	sentido
	TCCTGTCTTTGAGGGAAATCA	TT2	ratón	antisentido
13	CCCCAATCTCGATATGTTTGA	GATA4	ratón	sentido
	ATGGCCCCACAATTGACA	GATA4	ratón	antisentido
10	TCAAGAGTCATAAAATTCTGCTG	MEF2C	ratón	sentido
	GGATGGTAACTGGCATCTCAA	MEF2C	ratón	antisentido
84	CGGAACTGAAAGCGAAAG	aMHC	ratón	sentido
	TCCTCGATCTTGTGCAACTTG	aMHC	ratón	antisentido
6.1	GGTGGAGGTACTAGCTGACCA	RUNX1	ratón	sentido
	GCCAGTGAGTGGGTAGCAC	RUNX1	ratón	antisentido
71	CTGTGGCAGCTCTCTGGAT	SCL	ratón	sentido
	GGTGTGGCTCCTCTGTGTAA	SCL	ratón	antisentido
22.1	ACCAGAGACCTCGTTTTCA	FLK1	ratón	sentido
	CATTGCTTGCAGGAGTTT	FLK1	ratón	antisentido
25	CAAGCATCTGGGATAAAGTGG	β H1	ratón	sentido
	ATCAGGAGCCTTCCCAGAGT	β H1	ratón	antisentido
66	TGCACCTGACTGATGCTGA	β -Globin	ratón	sentido
	CATCGGCGTTCACCTTTC	β -Globin	ratón	antisentido
30	GCTGGTGCTCTATGCAAGC	CD31	ratón	sentido
	ATGGATGCTGTTGATGGTGA	CD31	ratón	antisentido
32	AGGCTGATGCTGGTGCTAGT	CD34	ratón	sentido
	CAGGCCTAACCTCAGACTGG	CD34	ratón	antisentido
70	TGCGAGTACTCAACACCAACA	18S	ratón	sentido
	TTCCTCAACACCACATGAGC	18S	ratón	antisentido
	TTCACTGAGAAGGGCCTCTTGA	cTH	pollo	sentido
	CACAGGAGGACCAGAACTACCAGCCTG5G	cTH	pollo	antisentido
	CCCTGGAACCAGCTATGCAG	insulina	pollo	sentido
	CTACCTGCACGCTCTCCACACACCAGG5AG	insulina	pollo	antisentido
	ACGAGCCCTACACCCACAGC	cTH-INS1	pollo	sentido
	GATCCGCAGAAGAGGCACTGATCGGA5C	cTH-INS1	pollo	antisentido
	CCATGTTTGTGATGGGTGTCAA	GAPDH	pollo	sentido
	CAACTGAAGGGTGCCAGGCAG5TG	GAPDH	pollo	antisentido

En azul se muestran los cebadores del sistema *Universal probe* y en gris los cebadores del sistema Oligo LUX™.

13.- Estabilidad del mRNA.

Para el estudio de la estabilidad de los transcritos de cTH y de cTH-INS1, las células transfectadas se trataron con 100 μ M de 5,6-dicloro-1 β -D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB) (Sigma), un inhibidor específico de la RNA polimerasa II, a las 48 horas de la transfección. Las células se procesaron a las 0, 3, 6, 12 ó 25 horas después de haber añadido el inhibidor, para la extracción del RNA y posterior detección por *Northern Blot*.

14.- Experimento de pulso-caza e inmunoprecipitación.

Transcurridas 20 horas después de la transfección, las células HEK293T se incubaron durante 1 hora a 37°C en 1 ml/pocillo de medio sin Met/Cys. El medio sin Met/Cys se reemplazó por 300 µl/pocillo de medio sin Met/Cys, que contenía 50 µCi de [³⁵S] Met/Cys ProMix (Amersham Pharmacia Biotech, Essex, Reino Unido). Pasada la hora de incubación, el medio se reemplazó por medio de cultivo completo no radiactivo. Las células se lisaron a los tiempos indicados (0, 1, 2 y 4 horas), con 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 120 mM NaCl, 0,5% NP40 (Sigma), y un cocktail inhibidor de proteasas *mini EDTA free* (Roche).

Las muestras se homogeneizaron, y se clarificaron por centrifugación. El homogenado se incubó con un anticuerpo de conejo anti-TH (Chemicon) y proteína A-Sepharosa (Amersham), durante 16 horas a 4°C. El inmunoprecipitado se lavó 4 veces con tampón RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS (del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*) y 1% de ácido deoxicólico) y 1 vez con tampón TBS (20 mM de Tris-HCl pH 7,5 y 140 mM de NaCl), y se resolvió en un gel de poliacrilamida al 10% *NuPAGE* (Invitrogen). El gel se fijó en una solución de 50% metanol, 10% ácido acético en H₂O durante 30 minutos. Se secó con una solución de 40% metanol, 10% ácido acético, 5% glicerol en H₂O.

La cuantificación de las proteínas cTH y cTH-INS1 se realizó mediante exposición en pantalla *Fuji* usando el programa *Image-Gauge*.

15.-Generación de sondas.

15.1.-cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2 en pCIneo.

El clonaje de cTH y cTH-INS1 en pCIneo se realizó por RT-PCR a partir de RNA total de embrión de St10, utilizando los cebadores P1 y P2 para cTH, y P1 y P3 para cTH-INS1 (**Tabla 4**). Los fragmentos de amplificación se clonaron inicialmente en el vector pCR® II TOPO® (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, el fragmento clonado se escindió con la enzima *EcoRI*, y se clonó en pCIneo, linearizado con *EcoRI*.

El clonaje del cTH-INS2 (segundo transcrito quimera de insulina y tirosina hidroxilasa) se realizó en cuatro pasos: 1.-) RT-PCR de RNA de St4 para amplificar el extremo 3' de cTH-INS2 utilizando como cebadores P4 y P3. Extracción de gel de la banda correspondiente al cTH-INS2, de 843 pares de bases (pb). Clonaje del fragmento anterior en pCR® II TOPO®; 2.-) Escisión con *HindIII* de la mitad 5' del cDNA de cTH presente en el

pCR® II TOPO®-cTH; 3.-) Subclonaje del fragmento 5' del cDNA de cTH (paso 2) en el vector pCRII-cTH-INS2 (paso 1), linearizado con *HindIII*; 4.-) Escisión del cDNA de cTH-INS2 (paso 3) con *EcoRI* y clonaje del mismo en pCIneo linearizado con *EcoRI*.

15.2.-cTH y cTH-INS1 con epítipo V5.

Este clonaje se realizó utilizando el sistema Gateway (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: 1.-) RT-PCR con los cebadores P5 y P2 para cTH y P5 y P3 para cTH-INS1, utilizando como moldes pCIneo-cTH y pCIneo-cTH-INS1 respectivamente; 2.-) Ligación de los fragmentos amplificados en el vector pENTR-D TOPO® (Invitrogen); 3.-) Recombinación homóloga entre pENTR-D TOPO® cTH/cTH-INS1 y pcDNA 3.1/nV5-DEST (Invitrogen).

15.3.-Tbx5 en pCR® II TOPO®.

Para la sonda del Tbx5 de pollo se realizó RT-PCR de RNA de embrión de St10 usando los cebadores P6 y P7. El fragmento amplificado, de 1576 pb, se clonó en el vector pCR®II-TOPO®.

15.4.-cTH en pCAGGS y pCAGGS-STOP-IRES-GFP.

El cDNA de cTH se liberó de pCIneo-cTH cortando con *EcoRI* y se clonó en pCAGGS y en pCAGGS-STOP-IRES-GFP tras cortarlos con esta misma enzima.

15.5.-mTH en pCR® II TOPO®.

El cDNA de TH de ratón (mTH, del inglés *mouse Tyrosine Hydroxylase*) se clonó mediante RT-PCR a partir de RNA de cerebro adulto de ratón utilizando los cebadores P8 y P9. El fragmento amplificado de 1619 pb se clonó en el vector pCR®II-TOPO®. Este fragmento se subclonó en pBluescript II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) debido a la imposibilidad de obtener suficiente cantidad de plásmido a partir de la construcción pCR®II-TOPO®-mTH. Para ello se liberó el cDNA de pCR®II-TOPO®-mTH con la enzima *EcoRI*, y se clonó en pBluescript II SK+, previamente cortado con la misma enzima.

15.6.- Sonda de cDNA de cTH.

La sonda incluye la secuencia comprendida entre los exones 7 y 13 (806 pb) de *cTH*. La sonda se generó escindiendo pCIneo-cTH con *HindIII* y *XbaI*. *HindIII* corta en el exón 7 de cTH y *XbaI* corta en el vector pCIneo, 18 pb por debajo (*downstream*) del cDNA de cTH.

15.7.- Sonda de DNA genómico de cTH.

Se generó mediante PCR de DNA genómico de embrión de día embrionario 4 (E4), utilizando los cebadores P15 y P2, situados en los exones 11 y 13 de la *cTH* respectivamente. El fragmento amplificado, de 2891 pb se insertó en el vector pCR II®TOPO® (Invitrogen).

15.8.- Sonda de Neo.

Se generó por PCR de DNA genómico de ratón transgénico con los cebadores P12 y P13, para amplificar el casete Neo.

15.9.- Sonda de DNA genómico de mTH.

Se generó por PCR de DNA genómico de ratón silvestre con los cebadores P10 y P11, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 800 pb. Debido a la aparición de otras amplificaciones además de la amplificación que correspondía al tamaño esperado, la banda de DNA de interés se extrajo de un gel de 1% agarosa en Tris-Acetato-EDTA (TAE) con el *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore, MA, EEUU). Tras la purificación se insertó en pCR II®TOPO®.

La identidad y fidelidad de todos los productos amplificados se verificó por secuenciación de los mismos.

15.10.-Sondas de VMHC-1, AMHC-1 y Nkx2.5.

Las sondas para detectar VMHC-1 (del inglés *Ventricular Myosin Heavy Chain 1*) y de AMHC-1 (del inglés *Auricular Myosin Heavy Chain 1*) fueron cedidas por Dr. D. Bader (Bisaha y Bader, 1991). Para Nkx2.5 fue cedida por Dr. T.M. Schultheiss (Schultheiss y cols., 1995).

16.- Southern Blot.

Se digirieron 20 µg de DNA genómico de pollo o 10 µg de DNA genómico de ratón con las enzimas indicadas.

Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1%, durante 6 horas a un voltaje constante de 70 V. El gel se trató con las siguientes soluciones: primero 15 minutos con solución de depurinación (0,5 M HCl), después 30 minutos con solución de desnaturalización (0,5 N NaOH y 1,5 M NaCl), y finalmente 30 minutos con solución de neutralización (0,5 M Tris-HCl, pH 8). Con este tratamiento se consiguió la fragmentación del DNA, lo que facilitó la transferencia de productos de alto peso molecular.

La transferencia de los productos de las digestiones enzimáticas se realizó por capilaridad durante 16 horas, a una membrana de nylon (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Se fijó el DNA a la membrana por luz ultravioleta (UV) con el horno *Stratalinker* (Stratagene).

El DNA genómico de pollo se obtuvo a partir de patas de embriones de E4. El DNA genómico de ratón se extrajo de una porción de cola de 1 cm. Una pequeña porción de tejido muscular de pollo proveniente de la pata, o la porción de cola del ratón se lisaron en un tampón que contenía 40 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 0,5% SDS y 200 mM NaCl con 0,3 mg de proteinasa K (Roche Diagnostics) toda la noche a 55°C. Posteriormente, se llevó a cabo una extracción con 1/2 volumen de fenol y 1/2 volumen de cloroformo, seguida de una segunda extracción con 1 volumen de cloroformo. El DNA se precipitó con 0,1 volúmenes de 3 M acetato sódico pH 5,2 y 2 volúmenes de 96% etanol frío. Tras dos horas a -80°C ó 18 horas a -20°C se centrifugó a 14,800 xg durante 30 minutos. El precipitado se lavó con 70% etanol y se resuspendió en TE (10 mM de Tris- HCl pH 7,4 y 1 mM de EDTA a pH 8).

El marcaje de las sondas se realizó con [³²P]- dCTP, utilizando el *Prime-It® II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene).

La membrana se prehibridó a 42° C con una solución que contenía 50% formamida, 1X Denhardt [0,02% de ficol, 0,02 % de polivinilpirrolodona y 0,02 % de BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*)], 1% de SDS, 5X SSC (150 mM de NaCl y 15 mM de citrato sódico a pH 7,2) y 0,1 mg/ml de DNA de esperma de salmón (Invitrogen) durante al menos 2 horas; posteriormente se hibridó a 42° C durante 16 horas con la solución de prehibridación, a la que se le añadieron 1,5-2,0 x 10⁶ cuentas por millón/ml (cpm/ml) de la sonda. Tras la incubación se retiró la solución de hibridación y se realizaron dos lavados de 15 minutos con 2X SSC a temperatura ambiente y uno con 2X SSC y 0,5 % de SDS 30 minutos a 62,5°C.

La intensidad de las bandas se midió por exposición en pantalla *Fuji* y lectura con un aparato *Fuji Film FLA 3000*.

17.- Northern Blot.

10 µg de RNA total de células transfectadas se resuspendieron en un tampón que contenía 50% de formamida, 17% de formaldehído, 1X MOPS (20 mM de ácido sulfónico 4-morfolinopropano, 5 mM de acetato sódico y 1 mM de EDTA) y 170 ng/µl de bromuro de etidio. El RNA se separó en un gel al 1,25% de agarosa que contenía MOPS y 17 % de

formaldehído, y se transfirió por capilaridad durante 16 horas a una membrana de nylon (Schleicher & Schuell); seguidamente, el RNA se fijó a la membrana por radiación UV en un horno *Stratalinker* (Stratagene).

La membrana se hibridó a 42°C con la solución de prehibridación (50% de formamida, 1X Denhardt, 1% de SDS, 5X SSC y 0,1 mg/ml de DNA de esperma de salmón) durante 2 horas. Posteriormente se incubó unas 16 horas con la solución de prehibridación pero conteniendo además 5% de sulfato de dextrano y $1,5 \times 10^6$ cpm/ml de la sonda marcada con [32 P]dCTP. La membrana se lavó con 1X SSC y 0,5% de SDS durante 20 minutos a temperatura ambiente seguido de tres lavados con 0,2 X SSC y 0,5% de SDS de 15 minutos a 68°C.

La sonda pCIneo-cTH (apartado 15.1) se utilizó para la detección del mRNA de cTH, así como el de cTH-INS1.

Las mismas membranas se sometieron a una segunda hibridación con una sonda de la GAPDH, o del 18S rRNA que permite normalizar la carga relativa. Previamente, se realizó la limpieza de la membrana de la hibridación anterior con 0,1X SSPE (15 mM NaCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 0,1 mM EDTA, pH 7,4) y 0.5% de SDS, calentado hasta ebullición (2 lavados de 15 minutos).

La intensidad de las bandas se midió por exposición en pantalla *Fuji* y lectura con un aparato *Fuji Film FLA 3000*, para su posterior cuantificación con el programa *Image-Gauge* (Fuji).

18.- Extracción protéica y Western Blot.

Para la extracción de proteína, las células se lisaron en 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 300 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 1% de Triton X-100 y un cóctel de inhibidores de proteasas *mini EDTA free* (Roche). Los homogeneizados se mantuvieron 15 minutos en agitación a 4°C y se clarificaron por centrifugación.

Para la inmunodetección en membrana (*Western Blot*), el contenido de proteína de los sobrenadantes se midió con el *Kit BCA protein assay* (Pierce, Rockford, EEUU). Generalmente, entre 20 y 80 µg de extracto proteico se fraccionó en un gel al 10% *NuPage* (Invitrogen) y se transfirió a membranas de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia húmeda (Biorad, CA, EEUU), utilizando métodos estándar. Las membranas se bloquearon con 3% BSA en PBST (PBS y 0.05% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la detección de la TH se utilizaron dos anticuerpos (ambos de Chemicon), uno de conejo, y otro de ratón, evitando de esta forma reacciones cruzadas. La membrana se incubó con anticuerpo anti-TH 1:5000 durante 16 horas a 4°C, seguido de una incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón o conejo acoplado a peroxidasa (Sigma) 1:10000 durante 1 hora. Para la detección del epítipo V5, la membrana se incubó con un anticuerpo anti V5 1:5000 (Invitrogen) durante 16 horas a 4°C, seguido de una incubación con anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma), 1:10000 durante 1 hora.

Los anticuerpos se prepararon en 1% BSA en 0,1% PBST y los lavados entre anticuerpos se realizaron con PBST. Finalmente se reveló la señal con el sistema *SuperSignal* (Pierce) exponiendo la membrana a películas X-Omat (Kodak, NY, EEUU).

Para normalizar la carga relativa, las mismas membranas se volvieron a hibridar con anticuerpo anti- β -tubulina de ratón 1:10000 (Sigma), o anti-actina de cabra 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU). Para ello, se realizó previamente una limpieza de la membrana con una solución de 0,1% de rojo *Ponceau S* en 5% de ácido acético durante 30 minutos.

Las bandas específicas se cuantificaron en un densitómetro (Biorad) con la ayuda del programa *Quantity One*.

19.- Medida de catecolaminas por HPLC.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Ana Isabel Valenciano, de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Las muestras se lisaron con 0,3 N HClO₄, 0,4 M bisulfito sódico y 0,4 mM EDTA. Como estándar interno, la solución llevaba 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA) (100 pmol/ml). Las muestras se sonicaron y centrifugaron a 15000 xg durante 5 minutos a 4°C. La L-DOPA y dopamina se cuantificaron a partir de un volumen de 20 μ l, obtenidos del sobrenadante, mediante HPLC según lo descrito en De Pedro y colaboradores (1997). A dicho método de cuantificación se le introdujeron ciertas modificaciones: la fase móvil estaba formada por 10 mM ácido fosfórico, 0,1 mM EDTA, 0,4 M octanosulfonato de sodio y 3% acetonitrilo (pH 3,1). El potencial del electrodo analítico fue de 200 mV. Las proteínas insolubles en HClO₄, se resuspendieron en 0,5 N NaOH, y se cuantificaron mediante el Método de Lowry.

20.-Inclusión y secciones en parafina.

Los embriones de pollo se extrajeron del huevo con aritos de papel (ver apartado 2) en PBS frío. Se fijaron en 4% PFA en PBS-DEPC durante 16 horas a 4°C.

Los embriones de ratón se extrajeron de las deciduas en PBS frío y se fijaron en 4% PFA en PBS-DEPC durante al menos 16 horas a 4°C. El tiempo de fijación se aumentó para embriones de estadios más avanzados, llegando a ser de 3 días en el caso de los E15,5. El estadio embrionario se determinó estableciendo como día 0,5 el día en el que se detectó el tapón en las madres. Éstas se sacrificaron por dislocación cervical.

Los embriones de pollo y ratón se deshidrataron tras la fijación en etanoles al 50%, 70%, 90% y 100% a temperatura ambiente. Se incubaron secuencialmente en 50% etanol/50% HistoClear (National Diagnostics, Atlanta GA, EEUU) a temperatura ambiente, seguido de 100% HistoClear a temperatura ambiente (2 veces). Se pasaron a 50% HistoClear/50% parafina (Paraplast Plus embedding media, Sigma) a 58-60°C, y finalmente 100% parafina. Se realizaron varios cambios de 100% parafina a 58-60°C. El tiempo de cada uno de estos pases fue dependiente del estadio embrionario (deshidrataciones: pollo 5 minutos; ratón E8,5-30 minutos, E11,5-1 hora, E13,5-2 horas; 100% HistoClear: pollo 3-5 minutos; ratón E8,5-10 minutos, E11,5 y E13,5-20 minutos; 50% HistoClear/50% parafina: pollo 5 minutos; ratón E8,5-15 minutos, E11,5-20 minutos, E13,5-30 minutos; parafina: pollo 5-10 minutos; ratón E8,5-20 minutos, E11,5-40 minutos, E13,5-1 hora).

Los embriones incluidos en parafina se cortaron en secciones de 8 µm en un microtomo (Leica, Alemania). Las secciones se dejaron secar durante 16 horas a 37°C.

21.-Hibridación *in situ*.

Las hibridaciones *in situ* en embrión de pollo se realizaron en colaboración con la Dra. Carmen López Sánchez de la Universidad de Extremadura.

La hibridación *in situ* para pollo y ratón se realizó conforme a lo especificado en Nieto y colaboradores (1996).

21.1.-Síntesis de ribosondas.

Se digirieron 10 µg del plásmido con 100 unidades de la enzima apropiada, durante 2 horas, a la temperatura a la cual es activa dicha enzima. Transcurrido este tiempo, se comprobó que todo el vector presente en la muestra estaba linearizado mediante electroforesis de 200-300 ng del DNA de la digestión y 200-300 ng del plásmido no digerido, en un gel de agarosa al 1% en Tris-Borato-EDTA (TBE). El plásmido

completamente linearizado se extrajo con un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1) seguido de una segunda extracción con un volumen de cloroformo/isoamil alcohol (24:1). El plásmido linearizado, se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de 3 M acetato sódico pH 5,2 durante al menos 1 hora a - 20°C. El precipitado obtenido se lavó con un volumen de 70% etanol. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.

Para la síntesis de la ribosonda se incubó 1 µg de plásmido linearizado con una mezcla que contenía: 2 µl de 10X tampón de transcripción, 2 µl de 0,1 M ditioneitol (DTT), 2 µl de 10X nucleótidos marcados con digoxigenina, 0,5 µl de inhibidor de RNasas, 1 µl de RNA polimerasa adecuada (típicamente SP6, T7 ó T3) (todo de Roche) y hasta completar un volumen de 20 µl con agua libre de RNasas, a 37°C durante 2 horas. La ribosonda sintetizada se precipitó con 16,4 µl de agua libre de nucleasas, 1,6 µl de 0,5 M EDTA, 2 µl de 8 M cloruro de litio y 120 µl de etanol absoluto durante 2 horas a -20°C. Se centrifugó transcurrido este tiempo a 12000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se lavó con 70% etanol y se centrifugó a 9000 r.p.m. durante 10 minutos 4°C. Se resuspendió en 100 µl de 10 mM EDTA. Para comprobar la calidad de las sondas generadas, éstas se fraccionaron en geles de agarosa 0,8% (p/v) en TBE.

21.2.-Hibridación y revelado.

Los embriones completos se fijaron en 4% PFA en PBS, previamente tratado con DEPC y esterilizado, durante al menos 16 horas a 4°C. Se lavaron con PBTx (PBS-DEPC, 0,1% Tritón X-100) y a continuación se deshidrataron mediante incubaciones de 10 minutos en soluciones seriadas de metanol en PBTx a concentraciones crecientes (25%, 50%, 75%) y finalmente dos incubaciones de 10 minutos con 100% metanol. La rehidratación de las muestras se realizó con las mismas soluciones de metanol en sentido inverso y se lavaron dos veces con PBTx, (5 minutos cada vez).

Para eliminar la actividad peroxidasa endógena de las muestras, éstas se trataron con 1% H₂O₂ durante 5-30 minutos dependiendo del estadio embrionario (por ejemplo, 15 minutos para St10) a temperatura ambiente y en oscuridad, lavándolas posteriormente con PBTx durante 5 minutos.

Para mejorar su permeabilización, las muestras se trataron con 10 µg/ml de proteinasa K (Promega) durante un tiempo variable dependiendo del estadio (pollo: 4 minutos para St4-7; 7 minutos St7-10; 9 minutos St11-13. Ratón: 10 minutos E9,5; 15 minutos E10,5; 30 minutos E13,5) a temperatura ambiente y se lavaron con PBTx

durante 5 minutos. Posteriormente se refijaron los embriones con 4% PFA en PBTx durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBTx 5 minutos.

Los embriones se preincubaron con solución de hibridación durante 5 minutos a 57-60°C. Dicha solución estaba compuesta de una mezcla de 50% de formamida (v/v), 5X SSC, 2% de *Boehringer Blocking Powder* (p/v) (Roche), 0,1% de Tritón X-100 (v/v), 50 µg/ml de heparina (Sigma), 1 mg/ml de t-RNA (Sigma), 5 mM EDTA, 0,1% de CHAPS (p/v) (Calbiochem, Alemania) en agua DEPC. A los 5 minutos se reemplazó con solución de hibridación fresca, y se continuó la preincubación durante 4 a 16 horas a la misma temperatura. Las ribosondas se desnaturalizaron en solución de hibridación a 70°C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo. Transcurrido el tiempo de preincubación, los embriones se incubaron en el tampón de hibridación conteniendo 1 µg/ml de la ribsonda durante al menos 16 horas a 57-60°C. Los embriones se lavaron 5 veces a la misma temperatura de hibridación, con 2X SSC, 0,1% CHAPS (p/v) durante 5 minutos las dos primeras y 20 minutos las 3 restantes. Posteriormente se lavaron 3 veces con 0,2X SSC, 0,1% CHAPS, durante 20 minutos cada vez seguidos de tres lavados con 0,1% KTBT (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,1% Tritón X-100) durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Finalmente se procedió al revelado de la hibridación *in situ*: los embriones se bloquearon con 15% FBS (v/v), 0,7% de *Boehringer Blocking Powder* en 0,1% KTBT durante 2-3 horas a 4°C. Posteriormente se incubaron en anticuerpo de oveja anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina 1/1000 (Roche) en solución de bloqueo fresca, durante al menos 16 horas a 4°C. Tras la incubación se lavaron los embriones con 0,3% KTBT (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,3% Tritón X-100) durante al menos 3 horas cambiando la solución cada 30 minutos y un último lavado durante 16 horas a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1% Tween20 (Biorad), 1 mM levamisol (Sigma)). Los embriones se incubaron en oscuridad con 3 µl de NBT (del inglés *Nitro Blue Tetrazolium*) y 2,3 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indosil-fosfato) (ambos de Roche) en 1 ml de NTMT. Cuando el desarrollo del color azul típico del NBT/BCIP fue óptimo, la reacción se paró lavando los embriones con 0,3% KTBT. Se transparentaron con 70% glicerol, y se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Leica bajo la luz visible utilizando una placa de 2% agarosa como soporte.

22.-Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

22.1.-Inmunohistoquímica en embrión completo de pollo.

Los embriones completos se fijaron durante 16 horas a 4°C, con 4% PFA en PBS. La inmunohistoquímica se realizó como se describe en Patel y colaboradores (1989).

Los embriones fijados se lavaron con PBS 2 veces, 5 minutos cada vez, con PBTx (PBS, 0,2% BSA, 0,1% Tritón X-100), 2 veces durante 5 minutos, y otras 3 veces 30 minutos cada vez. Los embriones se bloquearon en PBTx con 5% NGS (del inglés *Normal Goat Serum*) (Sigma) (PBT+N) durante 2 horas. Se retiró esta solución y se añadió anticuerpo de conejo anti-TH 1/50 (Chemicon) ó anticuerpo de ratón anti MF20 1/200 (Hybridoma Bank Developmental Studies, Iowa, EEUU) (Sato y Yost, 2003) en PBT+N fresco. Se incubó durante 16 horas a 4°C. Se lavaron en PBTx 3 veces, 5 minutos seguidas de 4 veces, 30 minutos cada vez. Se incubaron en PBT+N durante 30 minutos. Se añadió el anticuerpo anti-conejo (para TH) o anti-ratón (para MF20) conjugado con peroxidasa en PBT+N fresco. Se incubaron durante 16 horas a 4°C. Se lavaron en PBTx 3 veces, 5 minutos cada vez, seguido de 4 lavados de 30 minutos cada uno. Para el revelado, se incubaron los embriones en la Solución A (33% diaminobenzidina (DAB), 66% PBTx) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió una mezcla de 1/75 Solución B (0,3% H₂O₂ en H₂O destilada) en Solución A fresca. Cuando el color marrón característico se hizo patente, la reacción se paró con PBS. Se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Leica bajo la luz visible.

22.2.-Inmunohistoquímica en secciones.

Los portas conteniendo secciones de embriones en parafina (apartado 20) se introdujeron en Histoclear 2 veces, durante 10 minutos cada vez. Cuando la parafina se eliminó por completo de las secciones, estas se rehidrataron en 100%, 90%, 70% y 50% etanol durante 2 minutos en cada uno de los alcoholes, salvo en el caso del 100% etanol, que se realizaron dos cambios de 2 minutos cada uno. Se lavaron con PBS durante 5 minutos. Las peroxidasas endógenas se inactivaron con 3% H₂O₂ durante 5 minutos. Se aclararon con H₂O destilada y se lavaron con TBS-Tx (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 en H₂O destilada), 3 veces durante 5 minutos. Se bloquearon con 10% FCS (del inglés *Fetal Calf Serum*) en TBS-Tx durante 30 minutos. Los portas se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron con 90-100 µl de

anticuerpo de ratón anti-TH 1/50 (Sigma) en TBS-Tx con 2% FCS. Cada porta se cubrió con Parafilm® para evitar la evaporación de la solución añadida y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Se lavaron con TBS-Tx, 3 veces durante 5 minutos. Se incubaron con 90-100 µl de anticuerpo biotinado de conejo contra ratón 1/100 (Dako), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portas se cubrieron de nuevo con Parafilm® para evitar la evaporación.

El revelado se realizó utilizando el *Vectastain ABC Kit*. Se preparó el complejo AB del *Vectastain ABC Kit*, 30 minutos antes de utilizarlo, mezclando en oscuridad 250 µl de 1 M Tris-HCl pH 7,5, 4,75 ml de H₂O, una gota del reactivo A y una gota del reactivo B.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, los portas se lavaron con TBS-Tx, 3 veces durante 5 minutos cada vez. Se añadieron 100 µl del complejo AB sobre las secciones y se incubaron durante 30 minutos. En este caso los portas no se cubrieron con Parafilm®. Se lavaron con TBS-Tx, 3 veces durante 5 minutos cada vez y se reveló con DAB (Sigma) durante 30 minutos en oscuridad o hasta que el color marrón característico era patente, a temperatura ambiente.

Para contrastar la zona marcada con el resto de los tejidos, las secciones se tiñeron con 0,5% de verde de metilo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con H₂O 3 veces (10 inmersiones; 10 inmersiones; 30 segundos) y con butanol 3 veces (5 inmersiones; 5 inmersiones; 20 segundos). Se introdujeron en Histoclear 2 veces, 10 minutos cada vez y se montaron con Histomount™ (National Diagnostics).

Se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Leica bajo la luz visible.

22.3.-Inmunohistoquímica tras hibridación *in situ*.

En los casos en los que se realizó tras hibridación *in situ*, se siguió el protocolo de López-Sánchez y colaboradores (2004).

22.4.-Inmunofluorescencia en secciones de embrión de pollo.

Las secciones se desparafinaron con Histoclear 2 veces durante 10 minutos cada vez y se rehidrataron como se reseña en el apartado 22.2.

Las secciones se lavaron con PBS 3 veces, 5 minutos cada vez y con PBTx (PBS, 0,5% Triton X-100) durante 10 minutos. Se bloquearon con 10% NGS en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-TH 1/50 (Chemicon) en solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C. Se

lavarón con PBS 3 veces, 5 minutos cada vez. Se bloquearon de nuevo durante 10 minutos en solución de bloqueo y se incubaron con anticuerpo de cabra contra conejo 1/200 marcado con Alexa 488 (Sigma) en solución de bloqueo fresca durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron con PBS 3 veces, 10 minutos cada vez y se montaron con 4% DABCO (p/v) y 70% glicerol (v/v), al cual se le añadió 1µg/ml de DAPI. Las fotos se tomaron en un microscopio confocal de Leica.

22.5.-Inmunofluorescencia en cuerpos embrionarios (CE).

Los CE formados a partir de las células troncales E14 se plaquearon el día 5 (**Fig. 8A**) sobre cubreobjetos circulares previamente tratados con 0,1% gelatina en PBS. Se fijaron con 4% PFA en PBS a diferentes tiempos durante 10 minutos a 4°C.

Los CE se lavaron con PBS 3 veces, 5 minutos cada vez y con PBTx (PBS, 0,5% Triton X-100) durante 10 minutos. Se bloquearon con 10% FCS en PBS y se incubaron con anticuerpo de ratón anti-TH 1/100 (Sigma) en solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C. Se lavaron con PBS 3 veces, 5 minutos cada vez y se bloquearon de nuevo durante 10 minutos en solución de bloqueo. Los CE se incubaron con anticuerpo de conejo contra ratón 1/50 marcado con FITC (del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*) (Dako) y 1/40 de faloidina marcada con rodamina (Invitrogen) en solución de bloqueo fresca durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron con PBS 3 veces, 10 minutos cada vez y se montaron con Histomount™. Las fotos se tomaron en un microscopio confocal de Leica.

23.-Tinción con hematoxilina-eosina.

Se desparafinaron las secciones con HistoClear 2 veces durante 10 minutos cada vez. Se rehidrataron con soluciones seriadas de 100%, 90%, 70%, y 50% etanol durante 10 minutos en cada una salvo en 100%, que se realizaron 2 veces durante 10 minutos cada vez. Se introdujeron en 0,5% hematoxilina (Sigma) durante 10 minutos. Se lavaron bajo agua corriente para eliminar los restos de hematoxilina, hasta que se identificó un color violeta característico. En los casos en que no apareció, quedándose las secciones con un color oscuro, los portas se introdujeron en alcohol ácido durante 5 minutos. Se lavaron de nuevo bajo agua corriente. Se introdujeron en 1% eosina (Sigma) durante 5 minutos. Se deshidrataron en soluciones seriadas de etanoles 50%, 70%, 90% y 100% durante 10 minutos en cada una salvo en el caso del 100% que se realizaron 2 veces, 10

minutos cada vez. Se introdujeron de nuevo en Histoclear 2 veces durante 10 minutos cada vez. Los portas se montaron con Histomount™. Se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Leica bajo la luz visible.

24.-Análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (del inglés *Statistical Package for the Social Sciences*) (Chicago, EEUU).

25.-Genotipado de los ratones *THKO*.

En 1995, el grupo del Dr. R.D. Palmiter generó dos líneas de ratones *THKO* (del inglés *Tyrosine Hydroxylase Knock-Out*) que denominaron Th4 y Th5 y se diferenciaban en la región del gen de *mTH* (del inglés *mouse Tyrosine Hydroxylase*) que había sido reemplazado por el casete Neo (**Fig. 9**). En ambas líneas, los ratones nulos (*THKO*), son letales embrionarios entre E11,5 y E15,5 (Zhou y cols., 1995).

El análisis histológico de los mismos mostraba acumulación de sangre en los grandes vasos sanguíneos, en el hígado y alteraciones estructurales del corazón. En E13,5 los ratones nulos presentaban dilatación y adelgazamiento auricular, así como desorganización y heterogeneidad de tamaño de los cardiomiocitos en algunas regiones ventriculares (Zhou y cols., 1995).

Nuestro grupo solicitó al Dr. Palmiter el ratón *THKO* que amablemente nos cedió. Recibimos 8 ratones (2 machos y 4 hembras), que según indicaciones del Dr. Palmiter correspondían a la línea Th4.

Para el genotipado de los mismos se utilizaron los cebadores P19, P20, P12 y P13. Los cebadores P19 y P20 amplifican una región de 185 pb del intrón 1 de la *mTH* (ausente en el alelo nulo). Los cebadores P12 y P13 amplifican una región de 310 pb del casete Neo. De esta forma, en los ratones heterocigotos aparecerían dos bandas, de 310 y 185 pb, en los ratones silvestres una banda de 185 pb, y en los *mTHKO* una banda de 310 pb (**Fig. 9A**). Después de analizar aproximadamente 200 embriones de varias camadas de cruces heterocigotos, de estadios embrionarios previos a E11,5 (E6,5, E7,5, E8,5), no se detectó ningún embrión nulo para *mTH*, aunque sí aparecían silvestres y heterocigotos (**Fig. 9B**).

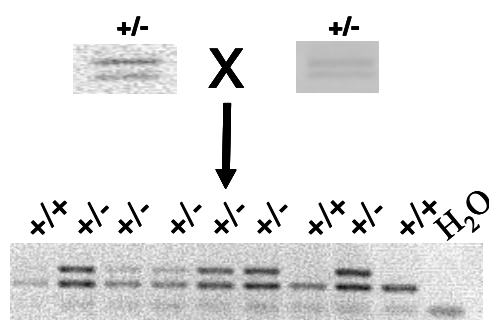
The diagram illustrates the pGEM-1 vector. It features a promoter, a Pkg site, a NeoR gene, and a multiple cloning site (MCS) with XbaI, P12, P13, and SstI sites. A SpeI site is also present. The vector is divided into segments numbered 2, 3, 10, 11, and 12. A black box represents the reporter gene.

The diagram illustrates the pCMVneo vector. It features a promoter region followed by a multiple cloning site with XbaI, SstI, and SpeI restriction sites. A cDNA fragment is inserted between the SstI and SpeI sites. The cDNA is flanked by P21 and P23 primers. The vector also contains a Pgk promoter, a NeoR gene, and a cDNA insertion site. The cDNA is flanked by P21 and P23 primers.

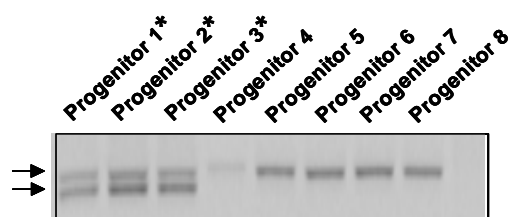
P19+P20= 185 pb **-Silvestre: 185pb**
P12+P13= 310 pb **-mTH+/-: 310 pb + 185 pb**
 -mTHKO: 310 pb

P21+P22= 330 pb -Silvestre: 330 pb
P21+P23= 280 pb -*mTH+*/-: 330 pb + 280 pb
-*mTHKO*: 280 pb

B



C



(C) El genotipado de los 8 ratones progenitores por PCR, con los cebadores descritos en **A** para la línea Th5, muestra que solo 3 de los 8 podrían ser ratones Th5 (*). Los dos flechas indican los alelos silvestre (flecha superior) y alelo interrumpido (flecha inferior) de *mTH*.

Por tanto, descartamos la posible contaminación del DNA genómico obtenido de los sacos embrionarios, con DNA genómico de la madre.

Ante estos resultados el Dr. Palmiter, nos informó de que probablemente nos había enviado la línea Th5, en lugar de la Th4 (Zhou y cols., 1995).

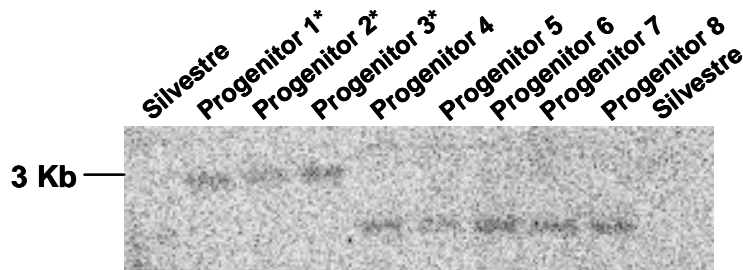
Para el genotipado de esta línea se utilizaron los cebadores P21, P22 y P23. La combinación de los tres cebadores en la misma reacción de amplificación nos permite distinguir los tres genotipos. Así, los cebadores P21 y P22 amplifican una región de 330 pb que incluye el exón 2 completo de la *mTH*. Los cebadores P21 y P23 amplifican el alelo nulo, al hibridar este último con el casete Neo, obteniéndose un fragmento de 280 pb (**Fig. 9A**). Con este nuevo sistema de genotipado, si el casete Neo no estaba insertado en la región de la *mTH* mencionado más arriba, aparecería una única banda correspondiente al alelo silvestre. El análisis de los 8 ratones progenitores enviados por el Dr. Palmiter reveló que sólo 3 de los 8 eran realmente ratones de la línea Th5 (**Fig. 9C**).

Para confirmar este resultado se realizó un análisis por *Southern Blot*. A partir de cada una de las muestras de DNA genómico de los progenitores se realizaron dos digestiones: una con la enzima *ApaI*, y otra con *SpeI*. Los DNAs digeridos con *ApaI* se hibridaron con una sonda contra el casete Neo. El tamaño de banda esperado es de 3379 pb si el casete Neo se encontrase en el alelo *mTH*, y los ratones perteneciesen a la cepa Th5. Como se muestra en la **Fig. 10A**, tan solo 3 de los 8 ratones progenitores pertenecían a dicha cepa. Como control se utilizaron dos ratones silvestres (carecen de casete Neo), que no muestran banda tras la hibridación con la sonda Neo (**Fig. 10A**). Los otros 5 ratones progenitores presentan una banda para Neo, pero no está localizada en el lugar indicado para la línea Th5.

Los DNAs digeridos con *SpeI* se hibridaron con una sonda de DNA genómico de *mTH*, que permitiría diferenciar el alelo silvestre de 8,4 Kb del alelo nulo de 6,8 Kb. Este segundo *Southern Blot* terminó de confirmar que tan solo 3 de los 8 ratones progenitores eran heterocigotos de la línea Th5 (**Fig. 10B**). Por tanto los otros 5 ratones, a pesar de contener el casete Neo, pertenecerían a ratones transgénicos con otro tipo de mutación o inserción génica.

GENOTIPADO DE PROGENITORES POR SOUTHERN BLOT.

A

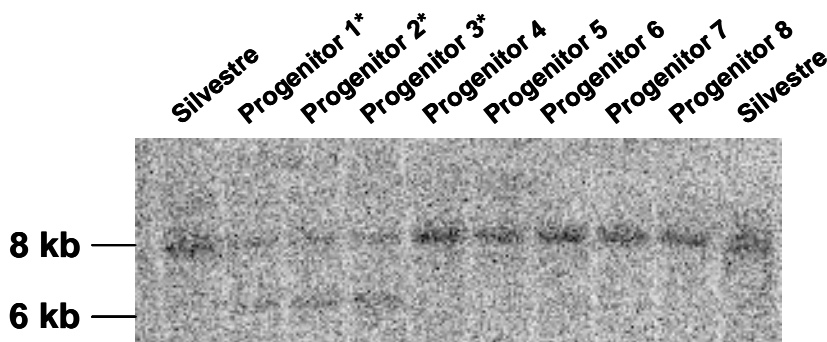


Enzima: *ApaI*

Sonda: Neo

Tamaño esperado si el casete Neo estuviese en el alelo *mTH*: 3379 pb

B



Enzima: *SpeI*

Sonda: DNA genómico de *mTH*

Tamaños esperados:

+Alelo silvestre ~ 8,4 kb

+Alelo nulo ~ 6,8 kb

Figura 10.-Genotipado de ratones progenitores por Southern Blot.

(A) *Southern Blot* realizado tras digerir el DNA genómico de los 8 ratones progenitores con la enzima de restricción *ApaI*, utilizando una sonda que hibrida con el casete Neo.

(B) *Southern Blot* realizado tras digerir el DNA genómico de los 8 ratones progenitores con la enzima de restricción *SpeI*, utilizando una sonda de DNA genómico que hibrida con el alelo *mTH*.

En ambos *Southern Blot* se han introducido dos muestras de ratones silvestres (en los extremos de la foto) como control negativo.

IV.-RESULTADOS

En vertebrados se conoce muy bien el papel postnatal de la insulina como hormona anabólica, esencial para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Su biosíntesis en las células beta del páncreas ha sido considerada un modelo de expresión tejido-específica. Sin embargo, estudios en invertebrados y en estadios embrionarios en vertebrados han mostrado que la insulina y su precursor la proinsulina, tienen funciones diferentes a su papel metabólico, como la regulación del tamaño celular, el control de *life span* y la supervivencia celular (Hernández-Sánchez y cols., 2006 (referencia 89)). Paralelamente a estas nuevas funciones, se han comenzado a describir distintos mecanismos de regulación génica a los descritos para la insulina pancreática. Recientemente, nuestro grupo ha descrito la presencia de transcritos embrionarios de insulina alternativos al transcrito pancreático (Hernández-Sánchez y cols., 2003; Mansilla y cols., 2005) que difieren de éste en su actividad traduccional. Entre los mRNA de insulina, que encontraron inicialmente las Dras. Catalina Hernández y Alicia Mansilla, en el embrión de pollo prepancreático había un transcrito quimera formado por la fusión del mRNA de la tirosina hidroxilasa y el de la insulina; a este transcrito le llamaron cTH-INS1. Cuando yo entré a formar parte del laboratorio, me incorporé al proyecto cuyo objetivo era la caracterización del transcrito quimera cTH-INS1.

1.-Identificación de transcritos quiméricos de tirosina hidroxilasa e insulina: cTH-INS1 y cTH-INS2.

En el genoma de pollo los genes de la *tirosina hidroxilasa* y de la *insulina* se encuentran en tándem en el cromosoma 5, situándose el gen de la *TH* 5' respecto al gen de la *insulina*. Esta organización sinténica se mantiene desde invertebrados (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) a vertebrados (pollo, ratón, humano). En pollo, el gen de la *TH* está formado por 13 exones codificantes, y el gen de la *insulina* por 3 exones, de los cuales son codificantes el 2 y el 3 (**Fig. 11A**). El transcrito cTH-INS1 comprende los 12 primeros exones y la parte 5' del exón 13, excluyendo el codón de terminación de la traducción, de la *cTH* fusionados a los exones 2 y 3 de la *insulina* (**Fig. 11A**). El exón 13 de la *cTH* contiene un sitio donador de procesamiento interno que interacciona mediante una reacción de transesterificación con el sitio aceptor de procesamiento del exón 2 de la insulina.

Durante el análisis de la expresión del transcrito cTH-INS1 mediante RT-PCR a partir de RNA de embrión de pollo de St10, encontramos un segundo transcrito quimera.

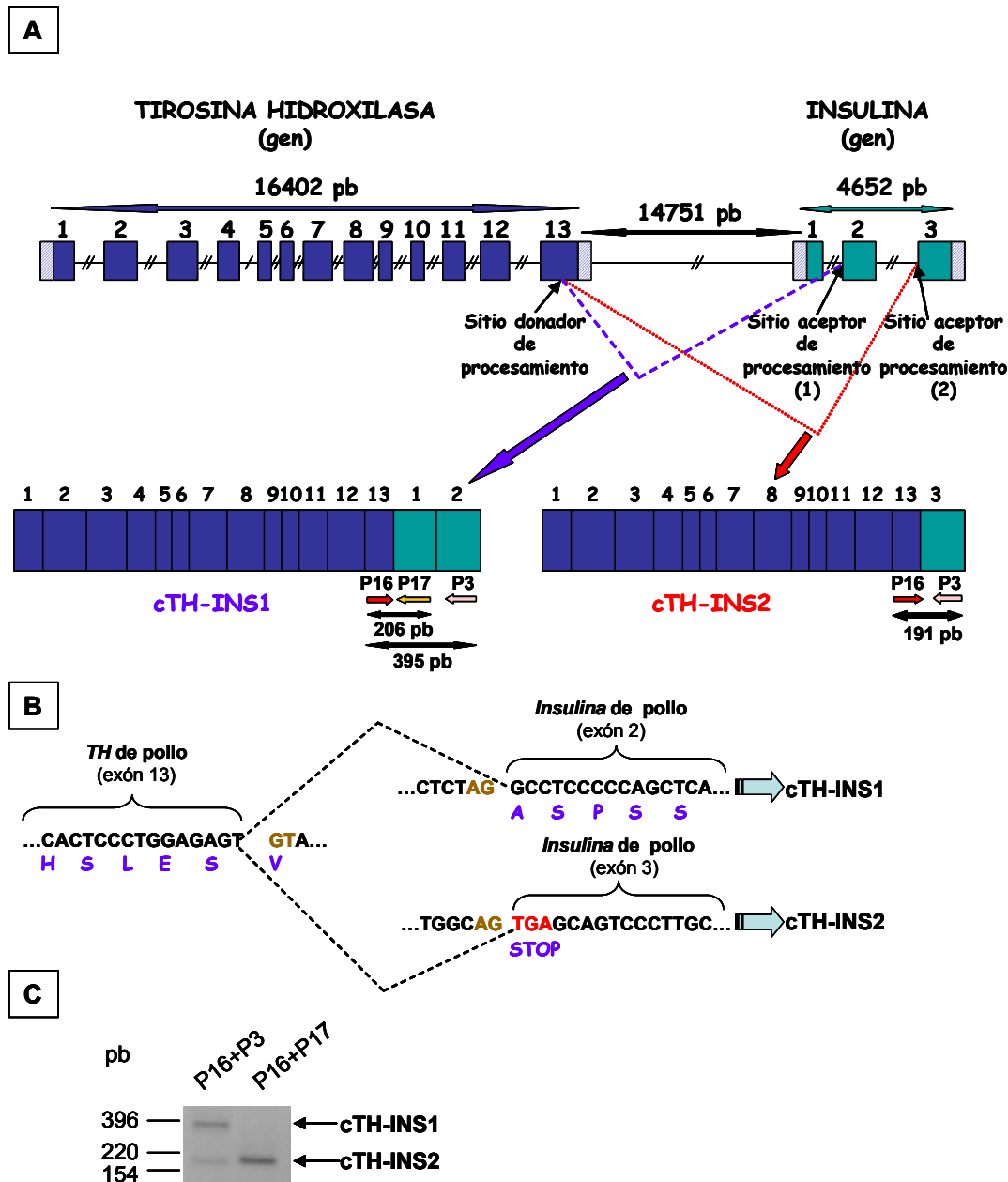


Figura 11.-Formación y caracterización de los transcritos quimera cTH-INS1 y cTH-INS2.

(A) Representación esquemática de los genes de la *tirosina hidroxilasa* e *insulina* de pollo, situados en el cromosoma 5.

Los exones se representan como rectángulos (azules para *cTH* y verdes para *insulina*). Las regiones 5' y 3' no traducidas de la *cTH* y de la *insulina* se muestran con rectángulos con rayas azules. Los intrones, así como la región intergénica aparecen como líneas horizontales entre los exones.

Bajo el esquema de los genes de *cTH* e *insulina* aparecen los transcritos cTH-INS1 y cTH-INS2. Ambos contienen los 12 primeros exones completos de *cTH* así como las primeras 109 pb del extremo 5' del exón 13 y difieren en la región de la *insulina* contenida en sus secuencias. cTH-INS1 contiene los exones 2 y 3 de la *insulina*, y cTH-INS2, únicamente el exón 3.

Se indican los cebadores utilizados en la RT-PCR, al igual que la longitud de los fragmentos de amplificación obtenidos.

(B) En el exón 13 de *cTH* se encuentra el sitio donador de procesamiento (en marrón) para la formación de los transcritos quimera. El sitio aceptor de procesamiento se encuentra en el exón 2, en el caso de cTH-INS1, o en el exón 3, en el del cTH-INS2, de la *insulina* (en ambos casos se muestra en marrón). Bajo la secuencia de nucleótidos se muestra la secuencia de aa correspondiente.

(C) RT-PCR de embrión de pollo de St10.

Utilizando los cebadores P16, localizado en el exón 13 de *cTH*, y P3, localizado en el exón 3 de la *insulina* (**Fig. 11A**), se amplificaron dos bandas. Cuando la amplificación se realizaba con los cebadores P16 y P17, localizado este último en el exón 2 de la *insulina*, aparecía una única banda (**Fig. 11C**). Tras la secuenciación de las bandas, se comprobó que la de mayor tamaño (395 pb) correspondía al transcrito cTH-INS1, siendo la de menor peso molecular (191 pb) una nueva forma quimérica que denominamos cTH-INS2. En esta nueva quimera, el sitio donador interno del exón 13 de la *cTH* realiza la reacción de transesterificación con el aceptor del exon 3 de la *insulina*, así la forma cTH-INS2 contiene la misma secuencia del mRNA de *cTH* que el cTH-INS1, pero sólo el exón 3 de la *insulina*.

2.-Análisis del número de copias del gen *cTH* en el genoma de pollo.

Para discernir si las quimeras eran un producto de la transcripción de dos genes independientes o eran producto de un gen quimérico no anotado en el genoma de pollo (Hillier y cols., 2004), se realizó un estudio por *Southern blot*. DNA genómico de pollo se digirió con tres enzimas de restricción (*Bam*HI, *Eco*RI y *Hind*III) y se hibridó sucesivamente con una sonda de DNA genómico y otra de cDNA de cTH (apartados 15.7 y 15.6, respectivamente, de Materiales y Métodos).

El patrón de bandas que se obtuvo en ambas hibridaciones era equivalente y estaba de acuerdo al tamaño esperado según la secuencia publicada del genoma de pollo (Hillier y cols., 2004) (**Fig. 12**). De esta forma se confirmó la existencia de un único gen para *cTH* en pollo, al igual que previamente se había descrito un único gen para la *insulina* (Perler y cols., 1980), descartando así la existencia de un gen quimérico.

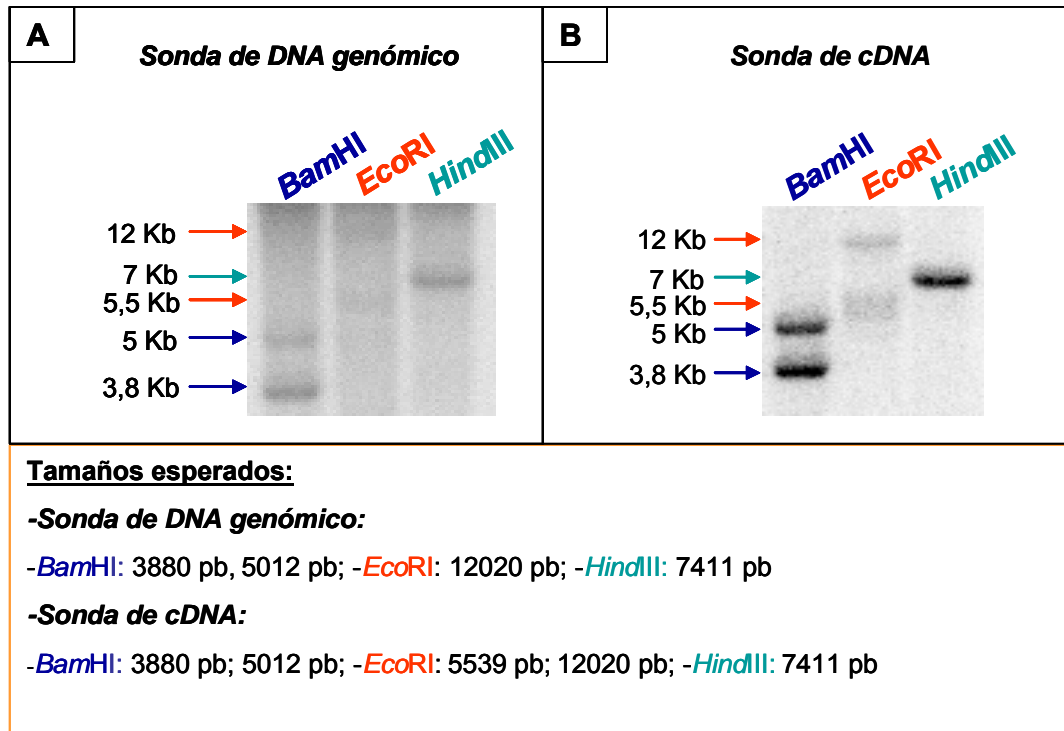


Figura 12.-Análisis del número de copias génicas para *cTH* por *Southern Blot*.

Los tamaños observados utilizando la sonda de DNA genómico de *cTH* (A) o la sonda de cDNA de *cTH* (B) son los mismos que los tamaños esperados, según la secuencia de DNA genómico publicada en las bases de datos.

3.-Análisis de la expresión de cTH-INS1 en el embrión de pollo.

Se estudió la expresión de la quimera más abundante, cTH-INS1, en el desarrollo embrionario mediante RT-qPCR. El transcrito cTH-INS1 se detectó desde estadios de gastrulación (St4) y sus niveles aumentaron desde gastrulación al inicio de la neurulación (St8), manteniéndose los niveles a lo largo de la neurulación (St8 y St10). Un patrón semejante se observó para los mRNA de insulina y de cTH (**Fig. 13**).

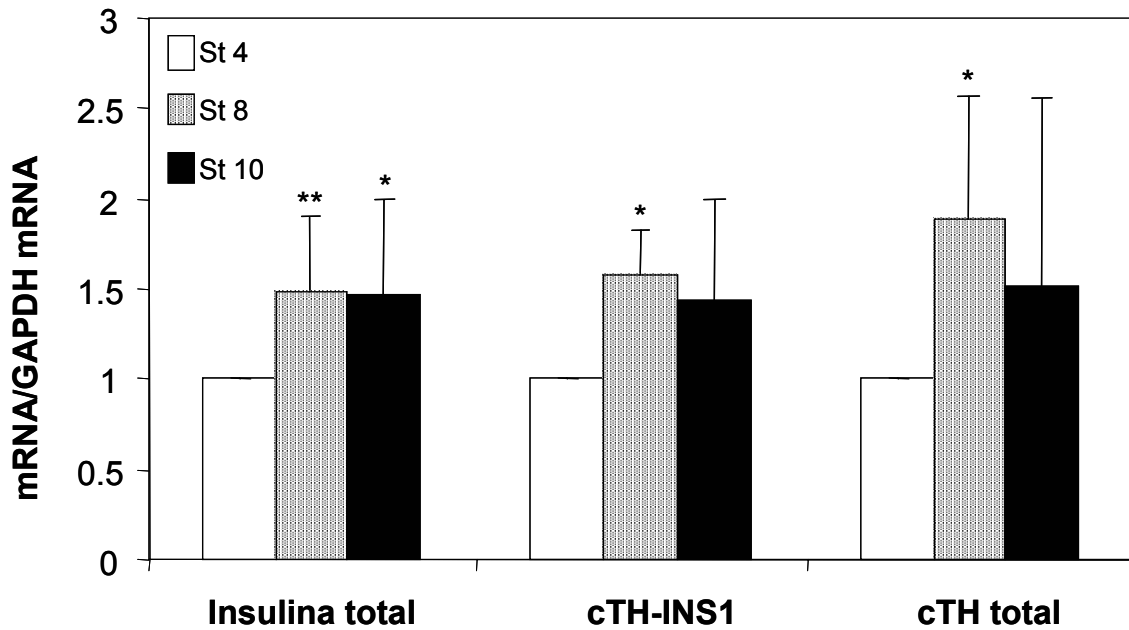


Figura 13.-Regulación de la expresión de cTH-INS1 en gastrulación y neurulación.

RT-qPCR de RNA de embriones de pollo de los estadios indicados. Los niveles de cada mRNA están normalizados respecto al mRNA de la GAPDH y relativizados con respecto a St4. Se muestran los datos representados por sus medias + desviación estándar. Las comparaciones se realizaron con el Test de Dunnet.

* $p \leq 0,05$

** $p \leq 0,01$

Seguidamente, comparamos la abundancia relativa del transcrito cTH-INS1 en embriones de St8, en páncreas, donde hay alta expresión de insulina, y en la *Substantia nigra*, que presenta altos niveles de cTH.

Las proporciones del mRNA de cTH-INS1 fueron diferentes en los tres tejidos analizados. Respecto al mRNA de insulina, la abundancia relativa más alta se halló en el embrión St8 (11,2%) mientras que la más baja fue en el páncreas embrionario de día 13 (0,01%) (**Fig. 14A**). Por el contrario, la *ratio* más alta del transcrito cTH-INS1 respecto al mRNA de cTH, fue en el páncreas de E13, (5,4%) y la más baja en la *Substantia nigra*, (0,1%) (**Fig. 14B**). Otro resultado interesante es que los niveles del mRNA de cTH-INS1 en embrión de pollo de St8 eran 3 veces superiores que los detectados en *Substantia nigra* de E18 (**Fig. 15A**), mientras que los niveles de cTH total eran 5 veces inferiores en embrión de St8 respecto a *Substantia nigra* (**Fig. 15B**). Este resultado va en contra de que las quimeras se originen como consecuencia de un fallo transcripcional estocástico por el que la maquinaria de transcripción ignoraría la terminación de la transcripción del gen de *cTH*, y continuaría transcribiendo el gen de la *insulina*. Tal tipo

de fallo implicaría mayores niveles de cTH-INS1 en los tejidos como la *Substantia nigra*, con mayor tasa de transcripción del gen de *cTH*.

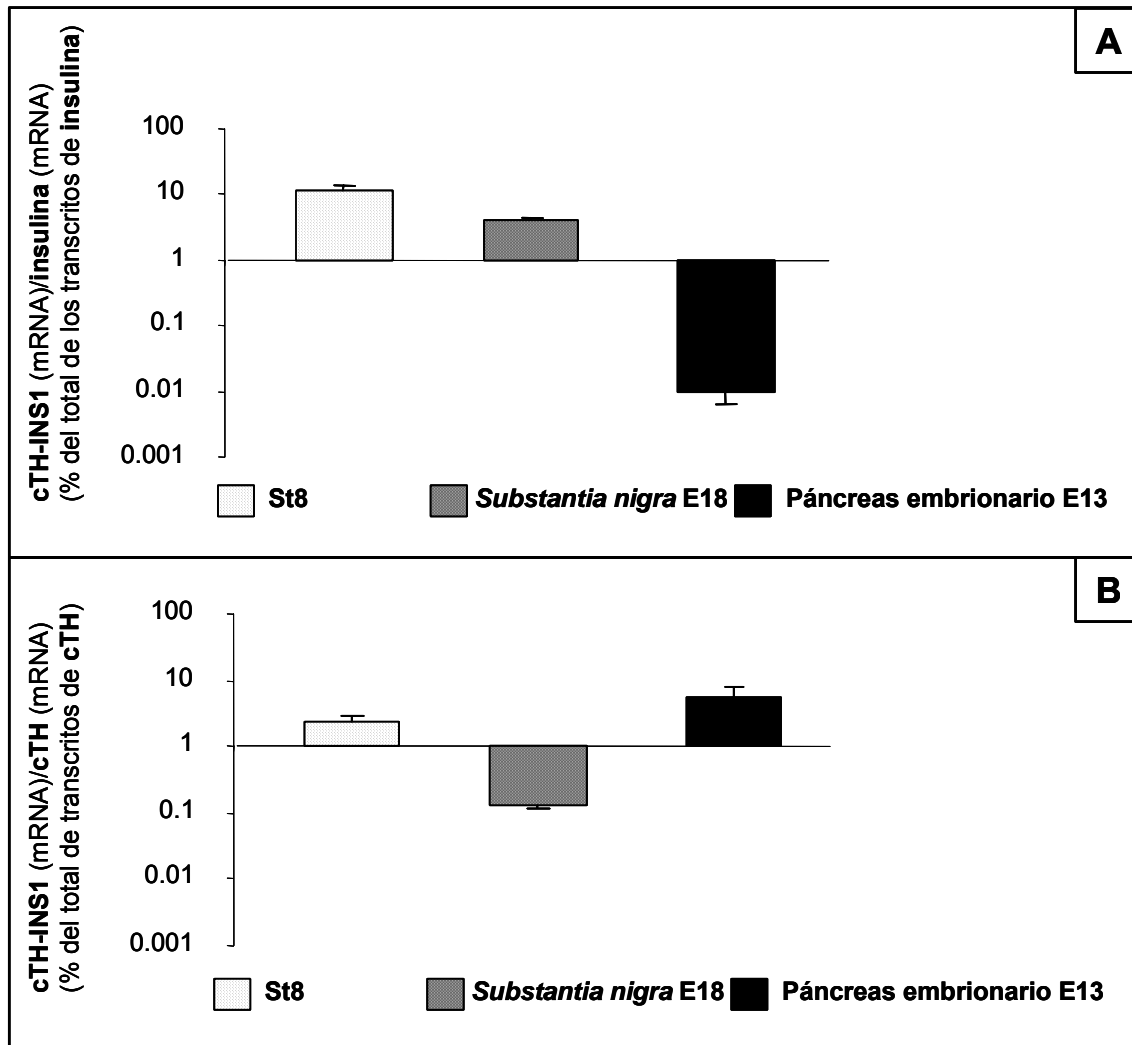


Figura 14.-Niveles de expresión de cTH-INS1 en relación a los niveles de insulina y cTH totales. Los niveles de mRNA de insulina total, cTH total y cTH-INS1 se cuantificaron por RT-qPCR. Representación de los niveles de cTH-INS1, con respecto a los niveles de insulina total (A) y cTH total (B). Se muestran los valores de la media + desviación estándar de un experimento realizado por duplicado.

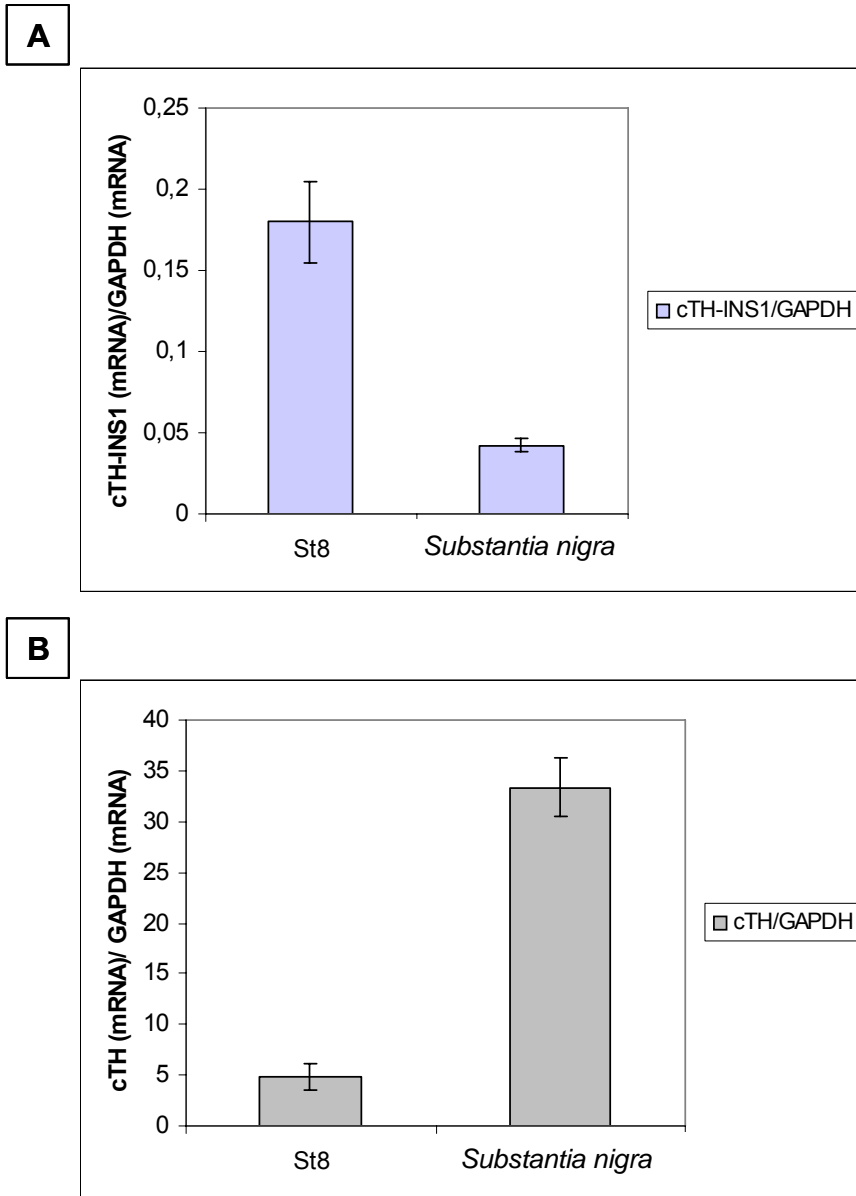


Figura 15.-Niveles de cTH-INS1 y de cTH en St8 y en *Substantia nigra*.

Los niveles de mRNA cTH y cTH-INS1 se detectaron mediante RT-qPCR. Se representan los niveles de cTH-INS1 (**A**) y cTH (**B**) corregidos por el mRNA de la GAPDH.

Se muestran los valores de la media \pm desviación estándar de un experimento realizado por duplicado.

4.-Análisis *in silico* de las proteínas cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2.

La forma canónica de la proteína TH de pollo está formada por 491 aa distribuidos en un dominio regulador, un dominio catalítico y un dominio de tetramerización. En este último, situado en el extremo carboxilo terminal, se encuentra un heptámero de leucinas (cremallera de leucinas) que son necesarias para la oligomerización de la molécula (**Fig. 16**).



Figura 16.-Comparación de las secuencias aminoacídicas de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2.

Alineamiento de las secuencias de aa de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2. Las leucinas (L) resaltadas en rojo en cTH constituyen la cremallera de leucinas del dominio de tetramerización. En cTH-INS1 y cTH-INS2 aparecen rodeados con un círculo rojo los aa que ocupan la posición de las leucinas que en cTH forman el dominio de tetramerización. Aparece en verde en la cTH-INS1 la extensión de 67 aa que difiere de cTH.

Como se ha mencionado anteriormente, la utilización del sitio donador de procesamiento interno del exón 13 de la *cTH* excluye los últimos 48 nucleótidos codificantes (dominio de tetramerización) y el codón de parada de la traducción de la *cTH*, de tal forma que el marco de lectura de la *cTH* se extiende en el de la insulina, aunque no mantiene la fase de lectura con el marco de la insulina. Así, la quimera cTH-INS1 codifica para una nueva isoforma de cTH que comparte el dominio regulatorio y catalítico con la cTH codificada por el mRNA completo, pero carece de los últimos 16 aa del dominio de tetramerización. Éstos son reemplazados por una extensión de 67 nuevos aa que no tienen homología con ninguna de las proteínas descritas hasta el momento en las bases de datos. En la quimera cTH-INS2 se introduce un codón de

parada de la traducción prematuro que da lugar a una cTH truncada en los últimos 16 aa. (**Fig. 11B y 16**).

5.-Expresión proteica de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2 en células transfectadas.

Para analizar la expresión proteica a partir de los transcritos quimera y confirmar la predicción *in silico*, los cDNA de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2 se clonaron en el vector de expresión pCIneo (apartado 15.1 de Materiales y Métodos) y se transfectaron en la línea celular HEK293T. A las 24 horas de la transfección, las células se procesaron para *Western Blot* con un anticuerpo dirigido contra la proteína TH completa. Como se muestra en la **Figura 17A** el anticuerpo reconoció las tres isoformas de cTH que presentaban una leve diferencia en su movilidad electroforética, de acuerdo con el estudio *in silico* (cTH-INS1 542 aa; cTH 491 aa; cTH-INS2 475 aa) (**Fig. 17A**). Notablemente, los niveles de la isoforma cTH-INS1 eran mucho menores que los de cTH y cTH-INS2. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los cDNA de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2 se transfectaron en la línea celular NIH3T3 (no mostrado).

La línea celular PC12 procede de un feocromocitoma de rata y expresa endógenamente el gen de la TH. Para comprobar que las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas transfectadas se mantenían en un sistema que expresa de forma natural la proteína TH, se transfectaron los cDNA de cTH y cTH-INS1, en las células PC12. Para distinguir la TH endógena de la expresada a partir de los cDNA transfectados, a éstos se les incorporó la secuencia codificadora para el epítipo V5 en el extremo 5', de tal forma que el epítipo V5 aparece fusionado al extremo amino terminal de las proteínas transfectadas, evitando así interferencia con el dominio de tetramerización de la TH. Utilizando un anticuerpo contra el epítipo V5, se comprobó que en las células PC12 también los niveles de la proteína formada a partir del cTH-INS1 seguían siendo inferiores a los de la proteína cTH (**Fig. 17C**).

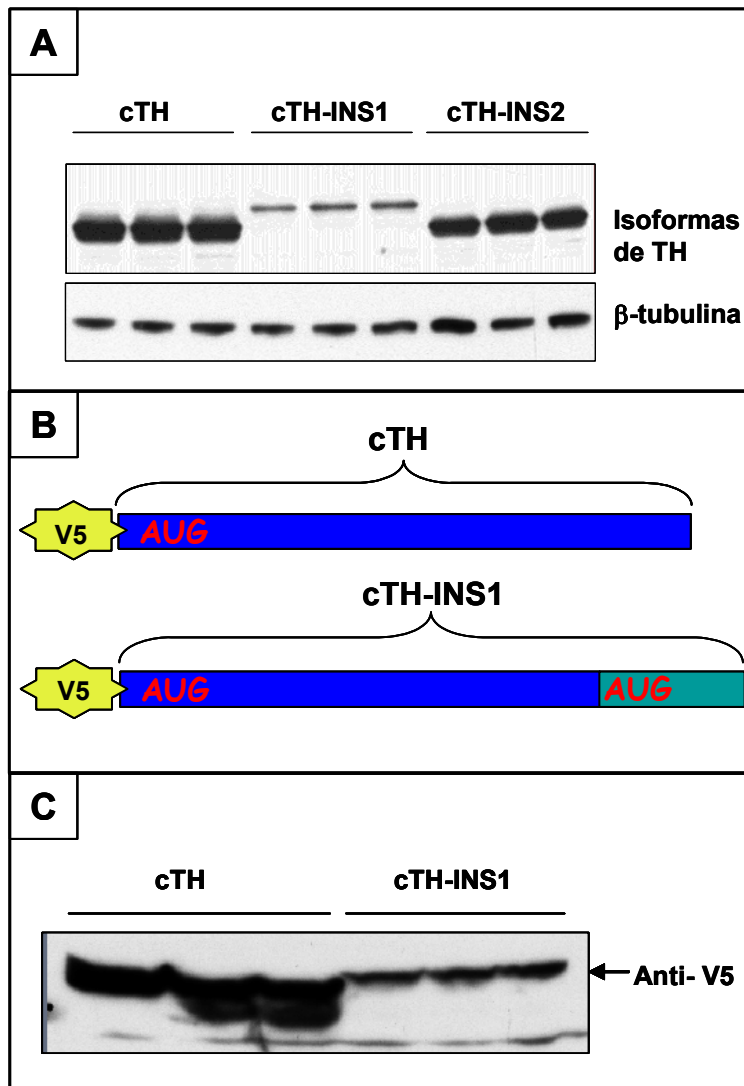


Figura 17.-Expresión proteica a partir de los transcritos de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2.

(A) *Western Blot* para TH de extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con los cDNA de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2. Se muestran triplicados de cada construcción. Como control de carga se utilizó la proteína β-tubulina.

(B) Representación esquemática de las construcciones cTH y cTH-INS1 fusionados al epítipo V5.

(C) *Western Blot* de extractos proteicos de células PC12 transfectadas con las construcciones representadas en (B). Se muestran triplicados de cada construcción.

6.-Niveles y estabilidad transcripcional de los transcritos cTH y cTH-INS1.

Para ver si las diferencias observadas en la expresión proteica podrían ser debidas a diferencias en niveles de mRNA, se analizó la expresión de los transcritos quimera en comparación con la del transcrito cTH. El *Northern Blot* del RNA de células transfectadas mostró que los niveles de expresión de los dos transcritos quimera eran semejantes entre sí y a los niveles de cTH (**Fig. 18A**). Además, los experimentos de estabilidad de mRNA (apartado 13 de Materiales y Métodos) mostraron que las cinéticas de degradación de los

transcritos quimera y de cTH eran equivalentes (**Fig. 18B y C**), confirmando así que las variaciones en expresión proteica no eran debidas a diferencias en los niveles de mRNA.

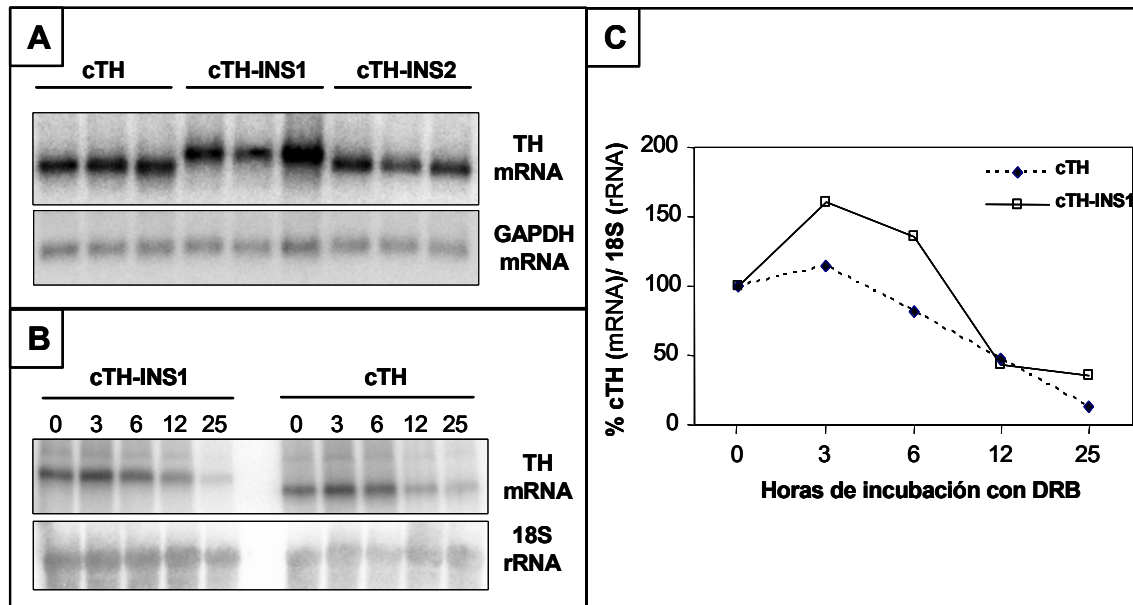


Figura 18.-Estabilidad transcripcional de cTH y cTH-INS1.

(A) *Northern Blot* para TH, de extractos de RNA de células HEK293T transfectadas con los cDNAs de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2. Los niveles, corregidos por la GAPDH son $1,95 \pm 0,21$ para cTH, $2,34 \pm 0,45$ para cTH-INS1 y $1,77 \pm 0,32$ para cTH-INS2. Se presentan triplicados de cada una de las construcciones.

(B) *Northern Blot* que muestra la cinética de degradación de los transcritos cTH y cTH-INS1. Los RNAs de células HEK293T transfectadas con cTH o cTH-INS1 se extrajeron a los tiempos indicados tras la adición de DRB (inhibidor de la polimerasa II) y se utilizaron para *Northern Blot*. Como control de carga se utilizó el 18S rRNA, que es transcrito por la RNA polimerasa III.

(C) Gráfica en la que se representa la cinética de desaparición de los transcritos cTH y cTH-INS1. Se muestran los niveles de cada transcrito corregidos por los niveles de 18S rRNA.

7.-Estabilidad de las proteínas formadas a partir de cTH y cTH-INS1.

Dado que los niveles de mRNA de cTH y cTH-INS1 son semejantes, seguidamente analizamos si las diferencias en niveles proteicos podrían venir determinados por una diferente eficiencia en la traducción, o bien por diferencias en la estabilidad de las proteínas. Mediante experimentos de pulso-caza e inmunoprecipitación en células transfectadas con los cDNA de cTH y cTH-INS1, comprobamos que la eficiencia de traducción de cTH-INS1 era incluso mayor que la de cTH, como se ve reflejado en el punto de 0 horas de la **Figura 19A**. Sin embargo, la cinética de degradación de la proteína cTH-INS1 es bastante más rápida que la de cTH (**Fig. 19A y B**). Así, la vida media es de 2 horas y 45 minutos para cTH, siendo tan solo de 48 minutos para cTH-INS1. Esta diferencia en estabilidad podría ser la responsable de los bajos niveles de expresión de la proteína TH-INS1.

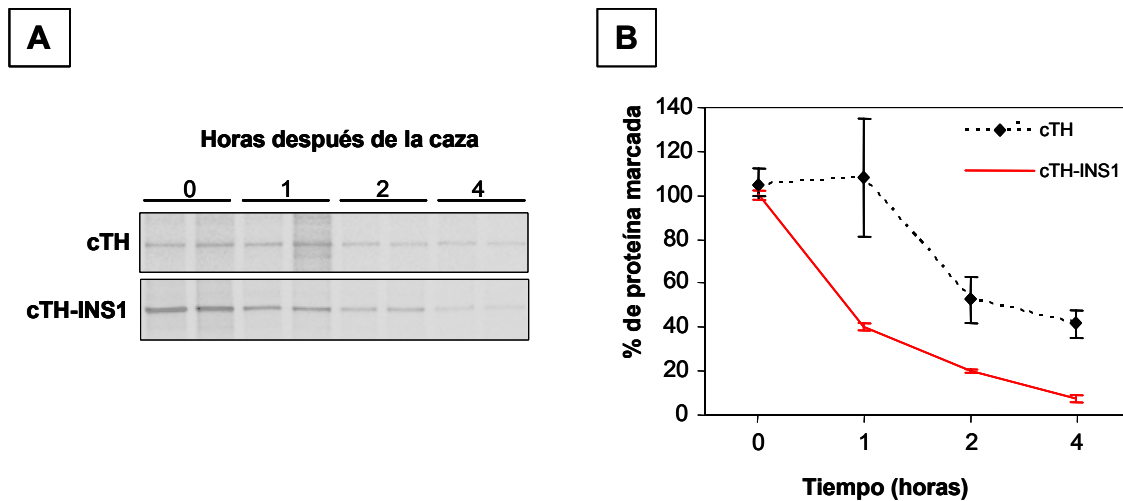


Figura 19.-Cinética de degradación de las proteínas cTH y TH-INS1.

(A) Inmunoprecipitación de las proteínas cTH y cTH-INS1 tras un experimento de pulso-caza en células HEK293T transfectadas con los cDNAs de cTH y cTH-INS1. Las muestras se presentan por duplicado para cada uno de los tiempos.

(B) Representación gráfica de la cinética de degradación de las proteínas cTH y cTH-INS1. En cada punto de la gráfica se muestra el error estándar de la media.

8.-Actividad enzimática de las proteínas cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2.

En condiciones nativas, la proteína TH oligomeriza a través de la cremallera de leucinas del dominio de tetramerización para formar un homotetrámero que es la forma completamente funcional, mientras que el monómero solo tiene un 25% actividad (Vrana y cols., 1994). Dado que las isoformas generadas a partir de los transcritos quimera tienen cambios en la composición de aa del dominio de tetramerización, en el caso de cTH-INS1, o carecen completamente del mismo, como cTH-INS2 (**Fig. 16**), estas dos proteínas podrían tener una actividad enzimática distinta de la cTH canónica. Como la TH cataliza la conversión de L-tirosina a L-DOPA, se midieron los niveles de L-DOPA mediante HPLC en células HEK293T transfectadas con los cDNAs de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2. Para conseguir niveles equivalentes de las tres proteínas las células se transfectaron con diferentes cantidades de vector (apartado 6 de Materiales y Métodos). Las células que expresaban cTH-INS1 y cTH-INS2 contenían 6 y 7 veces, respectivamente, menos L-DOPA que las células que expresaban cTH (**Fig. 20**).

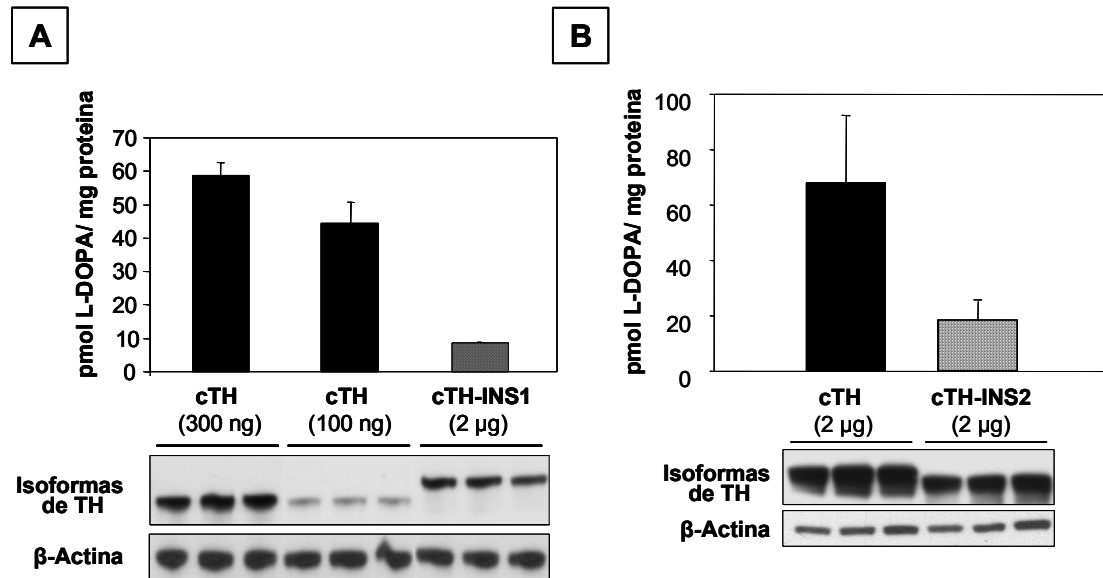


Figura 20.-Actividad enzimática de cTH, cTH-INS1 y cTH-INS2.

(A) Niveles de L-DOPA medidos por HPLC en células que expresan cTH o cTH-INS1. Bajo la gráfica se muestra la expresión de la proteína de un experimento representativo mediante el *Western Blot*. Como control de carga se utilizó β -actina.

(B) Niveles de L-DOPA medidos por HPLC en células que expresan la proteína cTH-INS2 en comparación a los niveles detectados en células que expresan cTH.

Las gráficas representan la media y desviación estándar de 3 experimentos.

9.-Los transcritos quimera cTH-INS1 y cTH-INS2 en otras especies.

Los transcritos quimera se buscaron en líneas celulares de otras especies y en embriones de codorniz, ratón, pez cebra y *Xenopus laevis* por RT-PCR, utilizando un cebador sentido dirigido contra el extremo 3' de la región codificante de la *TH*, y un cebador antisentido dirigido contra la secuencia codificante de la *insulina*.

Los transcritos TH-INS1 y TH-INS2 sólo se detectaron en embriones de codorniz y en la línea celular RTC5, derivada de retina de codorniz (**Fig. 21**). Los transcritos quimera en esta especie se forman de una forma semejante a los de pollo, es decir, utilizan un sitio donador de procesamiento interno en el exón 13 de *qTH* y el sitio aceptor de procesamiento del exón 2 ó del exón 3 de la *insulina*, formando así los transcritos qTH-INS1 y qTH-INS2 respectivamente (**Fig. 21**). Ambos productos de PCR se secuenciaron, descartando de esta forma la posibilidad de contaminación con amplificaciones de los transcritos quimera de pollo.

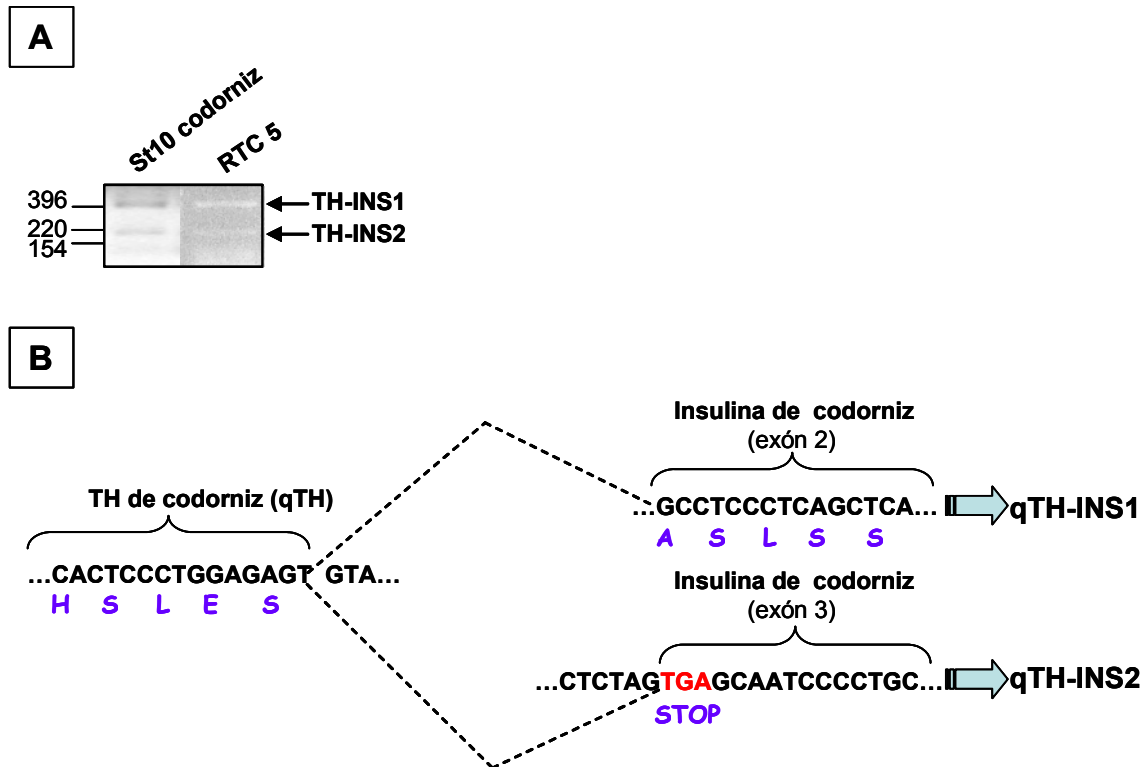


Figura 21.-Los qTH-INS1 y qTH-INS2 (*quail* TH-INS1/2) están presentes en embriones de codorniz así como en la línea celular RTC5.

(A) Detección mediante RT-PCR de los transcritos quimera en embrión de codorniz y en la línea celular RTC5

(B) Formación de las quimeras qTH-INS1 y qTH-INS2. Bajo la secuencia de nucleótidos se muestra la secuencia de aa para la cual codifican.

En este momento del proyecto nos plantemos que, para poder caracterizar la función de los transcritos quimera en el embrión, primero era necesario caracterizar el patrón de expresión y función de la cTH e insulina canónicas. De la expresión, regulación y función de la insulina embrionaria conocíamos varios aspectos por estudios previos de nuestro grupo (Morales y cols., 1997; Díaz y cols., 1999; Díaz y cols., 2000; Valenciano y cols., 2006). Sin embargo, poco o nada se sabía de la expresión y función de la TH en el embrión temprano, objetivos en los que se ha centrado el resto de mi proyecto de Tesis Doctoral.

10.-Análisis de la expresión de cTH.

La caracterización del patrón de expresión del gen de la cTH a lo largo del desarrollo se realizó por hibridación *in situ* en embrión completo de pollo. El mRNA de cTH se detectó a partir de St8 y su expresión estaba restringida a los primordios cardíacos (**Fig. 22A**). Secciones trasversales mostraron que el mRNA de la cTH se encuentra en el mesodermo esplácnico que dará lugar al corazón (**Fig. 22I**). La expresión en los primordios cardíacos se

mantiene en St9 (**Fig. 22C**). En St10, la señal se atenúa en la región ventricular (**Fig. 22D**), quedando restringida a partir de St11, al menos hasta St14, a la región auricular y polo venoso (**Fig. 22E-H**). Como se aprecia en la sección transversal del embrión de St13, a nivel auricular, la expresión se localiza en la capa del miocardio (**Fig. 22J**).

Además de la expresión localizada en la región cardíaca, también se detectó expresión transitoria del mRNA de cTH en la región caudal de embriones desde St12 a St14 (**Fig. 22F-H**) restringida a la capa ectodérmica (**Fig. 22K y L**).

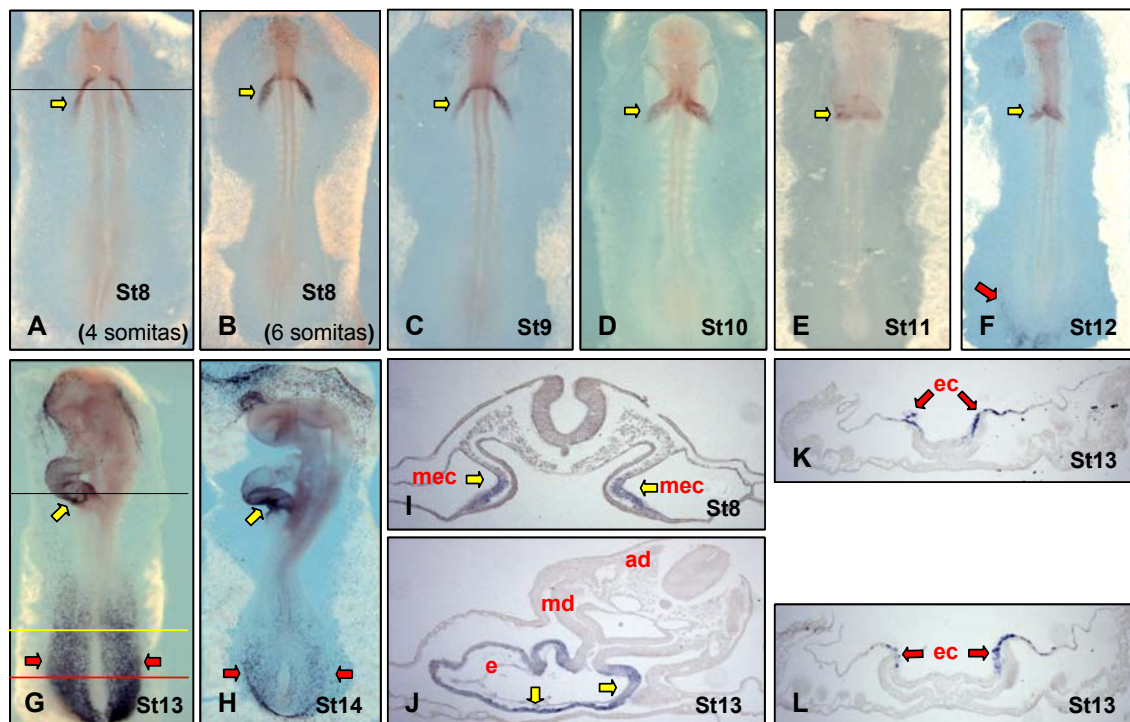


Figura 22.-Patrón de expresión de cTH por hibridación *in situ*.

Expresión del mRNA de cTH en embrión completo de pollo desde St8 (**A**) a St14 (**H**). (**I**) Sección transversal de embrión de St8 al nivel que se indica en **A** con una línea negra. (**J**) Sección transversal de embrión de St13 al nivel que se indica en **G** con una línea negra. (**K y L**) Secciones transversales de embrión de St13, al nivel que se indica en **G** con líneas amarilla (**K**) y roja (**L**).

Las flechas amarillas indican la expresión del mRNA de cTH en la región cardíaca. Las flechas rojas indican la expresión del mRNA de cTH en la región caudal.

ad: aorta dorsal; e: endocardio; ec: ectodermo; md: mesocardio dorsal; mec: mesodermo esplácnico del corazón.

Para verificar que el patrón de expresión del mRNA de cTH se corresponde con la expresión de la proteína, se realizó inmunohistoquímica en embrión completo. La proteína se detectó desde St9 asociada a los primordios cardíacos (**Fig. 23A**), concretamente al mesodermo esplácnico (**Fig. 23E**). En St11 (**Fig. 23B**), St13 (**Fig. 23C**) y St14 (**Fig. 23D**) la expresión de la proteína cTH, al igual que el mRNA, se restringe al polo venoso y región auricular.

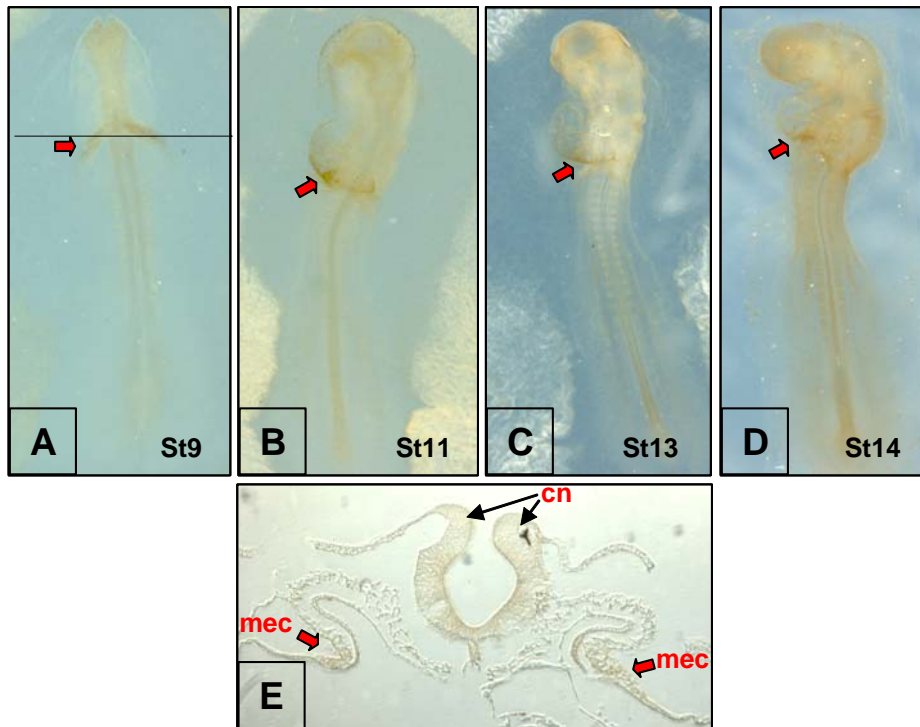


Figura 23.-Patrón de expresión de cTH por inmunohistoquímica.

Expresión de la proteína cTH en embrión completo de pollo de St9 (A), St11 (B), St13 (C) y St14 (D). (E) Sección transversal de embrión de St9 al nivel que se indica en A con una línea negra. Las flechas rojas indican la región de expresión de la proteína cTH en el corazón.
cn: crestas neurales; mec: mesodermo esplácnico cardíaco.

En estadios posteriores, la presencia de la proteína cTH se analizó por inmunohistoquímica fluorescente en secciones transversales. En St21 se detectó señal positiva para cTH en el epicardio y en una región entre aurícula y ventrículo, que por su posición anatómica corresponde al proepicardio (**Fig. 24**). La identidad de esta región debe ser confirmada en futuros experimentos con marcadores específicos.

Aunque por hibridación *in situ* no obtuvimos señal específica para el mRNA de la cTH en estadios anteriores a St8, se había detectado el mRNA de cTH en St4 por RT-qPCR (**Fig. 13**). Para ver si en fase de gastrulación, cuando se define la región precardiogénica o *Hfr*, la expresión de cTH también se asocia a esta región, comparamos por RT-qPCR los niveles de mRNA en las regiones precardiogénicas, respecto al embrión completo de diferentes estadios. Como se muestra en la **Figura 25**, la expresión de cTH está enriquecida en la *Hfr* de embrión de St5 y en los primordios cardíacos de St8, mientras que en St10 se encuentra en proporciones equivalentes en el asa cardíaca que en el resto del embrión.

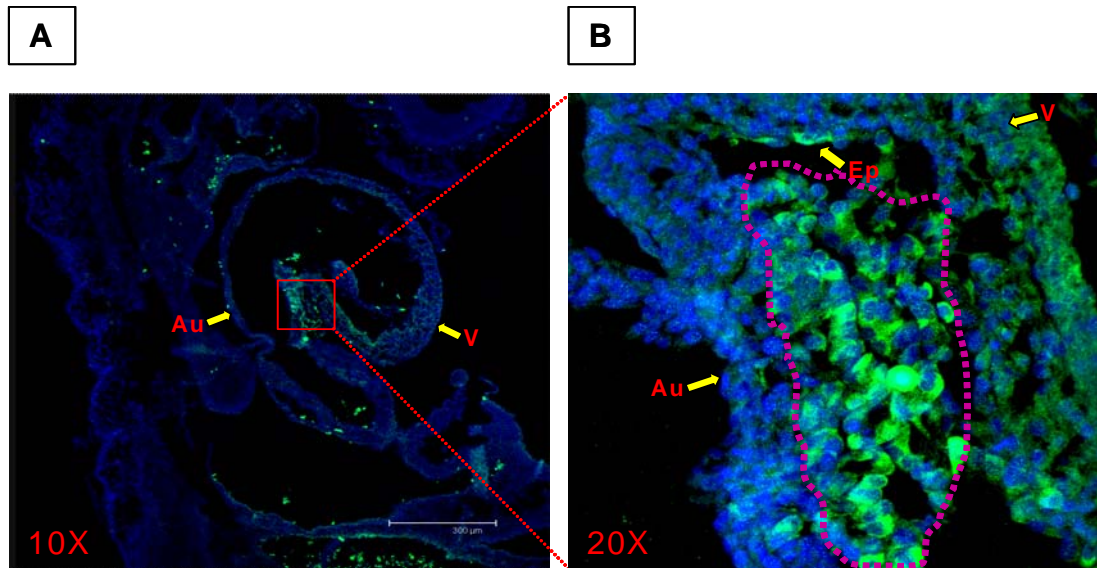


Figura 24.-Expresión de la proteína cTH en St21 de pollo.

(A) Inmunofluorescencia para cTH en sección sagital de pollo de St21. (B) Ampliación de la región señalada con un rectángulo rojo en A. cTH se detecta en una región existente entre aurícula (Au) y ventrículo (V), que corresponde al proepicardio (rodeado por línea discontinua en B), así como en el epicardio (Ep, en B).

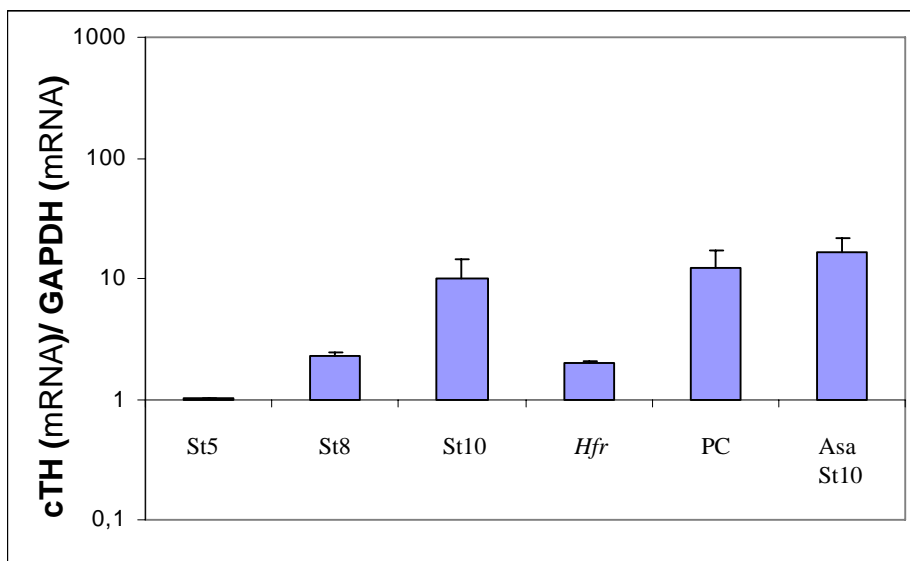


Figura 25.-Expresión de cTH por RT-qPCR en embriones completos y zona cardiogénica.

Representación de la expresión de cTH mediante RT-qPCR en embrión completo de pollo (St5, St8, St10) y en regiones concretas como *Hfr* de St5, primordios cardíacos de St8 (PC), o asa cardíaca de St10. Los niveles de cTH están corregidos por los niveles de GAPDH y las cantidades obtenidas están relativizadas con respecto a St5, al cual se le ha asignado el valor de 1. Los datos se muestran como la media + desviación estándar.

11.-Medida de las catecolaminas en embriones de pollo por HPLC.

La actividad enzimática de la TH está regulada por modificaciones postraduccionales como fosforilaciones en el dominio regulatorio, que mantienen el estado tetramérico de la proteína, y requiere de la presencia de cofactores como el hierro y la tetrahidrobiopterina (Fitzpatrick, 1989; Nagatsu, 1981). Para analizar la funcionalidad de la cTH embrionaria, se midieron los niveles de L-DOPA y dopamina en embrión completo. La L-DOPA es el producto directo de la reacción catalizada por la TH, y la dopamina es el resultado de la descarboxilación de la L-DOPA por la AADC, de expresión ubicua (**Fig. 1**). Como se muestra en la **Figura 26**, se detectaron L-DOPA y dopamina tanto en St8 como en St10, siendo los niveles de ambas mayores en St10. La presencia de L-DOPA y dopamina, indica que el embrión de pollo tendría enzimas cTH y AADC funcionales desde, al menos, St8.

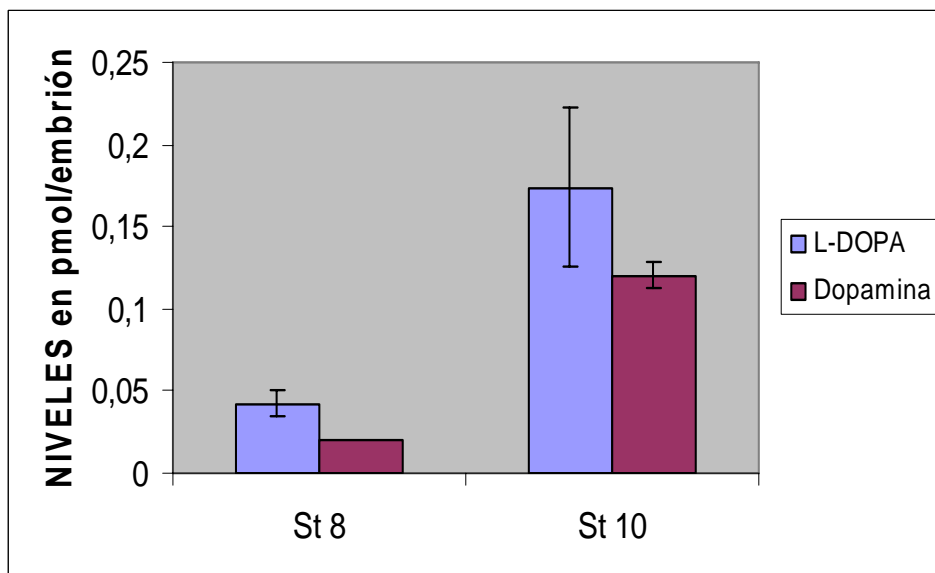


Figura 26.-Niveles de L-DOPA y dopamina en embriones de pollo.

Medida por HPLC de la producción de L-DOPA y dopamina en embrión de pollo de St8 y St10.

Se muestran los datos en pmol/embrión, correspondientes a las medias \pm la desviación estándar de 3 conjuntos de 15 embriones cada uno para el caso de St10, ó 2 conjuntos de 30 embriones cada uno para el caso de St8. El nivel de dopamina en St8 no presenta barra de desviación estándar por detectarse dopamina solo en uno de los dos conjuntos de embriones analizados.

En conjunto, estos resultados muestran que hay expresión de mRNA y proteína de cTH en el embrión temprano, previa a la formación de conexiones nerviosas, y que esta cTH es funcional. El patrón de expresión tanto del mRNA como de la proteína está

asociado a la región cardíaca a lo largo del desarrollo temprano, lo que sugiere que la cTH podría tener un papel en el desarrollo del corazón. Para analizar esta posible función, realizamos experimentos farmacológicos y genéticos de ganancia y pérdida de función en embriones.

12.-Efecto de la L-DOPA y de la dopamina, administradas en microesferas acrílicas de heparina.

Las microesferas acrílicas de heparina se utilizan en biología del desarrollo para ver el efecto local de factores de crecimiento u otras moléculas, sin alterar el desarrollo de regiones adyacentes. Utilizando esta metodología (descrita en el apartado 3 de Materiales y Métodos), se aplicaron exógenamente L-DOPA o dopamina en la región precardiogénica, *Hfr*, del embrión de St5, donde previamente había sido detectada la expresión del gen de la cTH por RT-qPCR. Las microesferas incubadas con 10 μ M L-DOPA o dopamina se implantaron en embriones en cultivo entre el endodermo y el ectodermo, lateralmente a la *Hfr* (**Fig. 27**). Tras 18-24 horas de desarrollo adicional con las microesferas, en los embriones que habían alcanzado el St10-11 se analizó la expresión de factores de transcripción y de proteínas contráctiles mediante hibridación *in situ*. Tanto la L-DOPA como la dopamina indujeron la expresión ectópica de los mRNA de factores de transcripción implicados en la determinación del linaje cardíaco como *Nkx 2.5* (**Fig. 27B y H**) y *Tbx5* (**Fig. 27C e I**). Así mismo, la L-DOPA y la dopamina inducían la expresión ectópica de los mRNA de proteínas contráctiles implicadas en la formación de las sarcómeras, como la miosina ventricular (VMHC-1) (**Fig. 27D y J**) y auricular (AMHC-1) (**Fig. 27E y K**). Además, mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo general contra la cadena pesada de la miosina (MF20), confirmamos que la expresión ectópica de estos mRNA se correspondía con la de la proteína (**Fig. 27F y L**).

Seguidamente estudiamos si las células adyacentes a la microesfera, además de expresar marcadores cardíacos, presentaban características morfológicas y estructurales semejantes a las de cardiomiocitos. Cortes semifinos de esta región mostraron que las células adyacentes a la microesfera (**Fig. 28A**) presentaban morfología similar a las células del miocardio del asa cardíaca (**Fig. 28D**). El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de estas células mostró que presentaban sarcómeras organizadas, en las que se podían distinguir las bandas A e I y el disco Z (**Fig. 28B**). Los discos Z son indicativos de cierto grado de madurez de las células cardíacas. Por

tanto, la dopamina no sólo induce la expresión de genes cardíacos sino también características estructurales de cardiomiocitos.

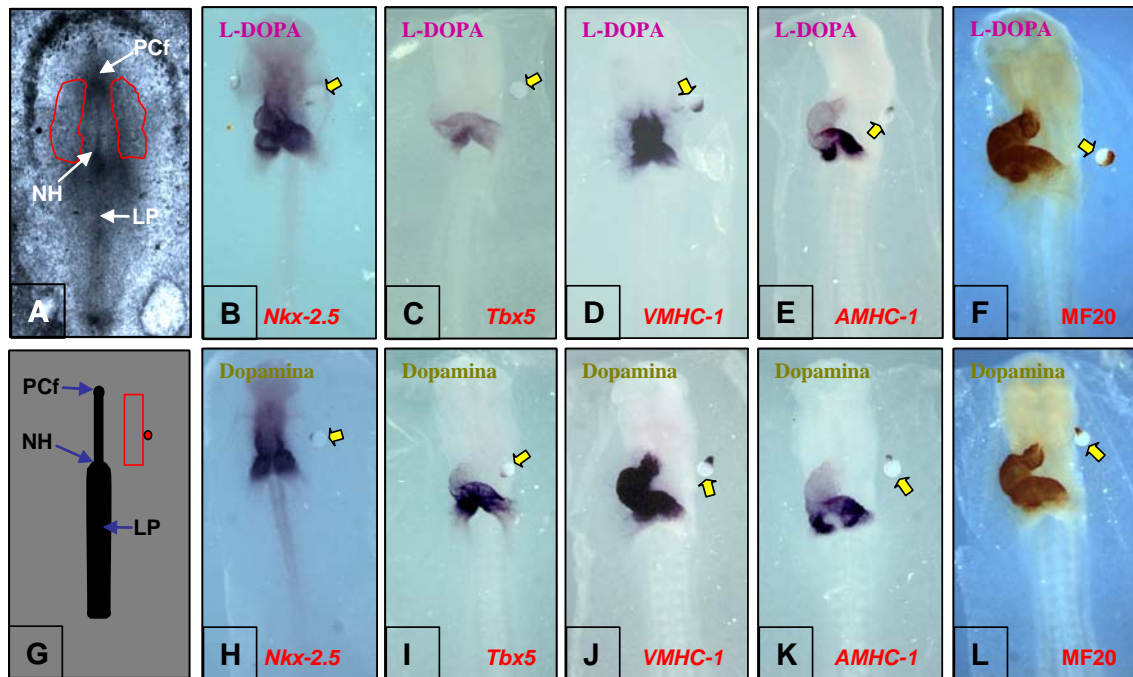


Figura 27.-La L-DOPA y la dopamina inducen de forma ectópica la expresión de marcadores cardíacos.

(A) Micrografía de embrión de pollo de St5 donde se indica rodeada en rojo, a ambos lados de la línea primitiva, la región *Hfr*. Microesferas acrílicas de heparina recubiertas de L-DOPA (B-F) o dopamina (H-L), implantadas en embrión de pollo de St5 en posición lateral a la *Hfr* (rectángulo rojo en G). Los embriones fueron analizados en St10-11 mediante hibridación *in situ* en embrión completo para *cNkx2.5* (B y H), *Tbx5* (C e I), *VMHC-1* (D y J), *AMHC-1* (E y K). Inmunohistoquímica en embrión completo con MF20 (F y L). (G) Diagrama de embrión de pollo de St5 donde se indica la posición de la *Hfr* mediante un rectángulo rojo y la de la microesfera (círculo rojo) en el momento de su implantación.

Con flechas amarillas se indica la posición en la que se encuentran las microesferas.

PCf: proceso cefálico; NH: Nódulo de Hensen; LP: línea primitiva.

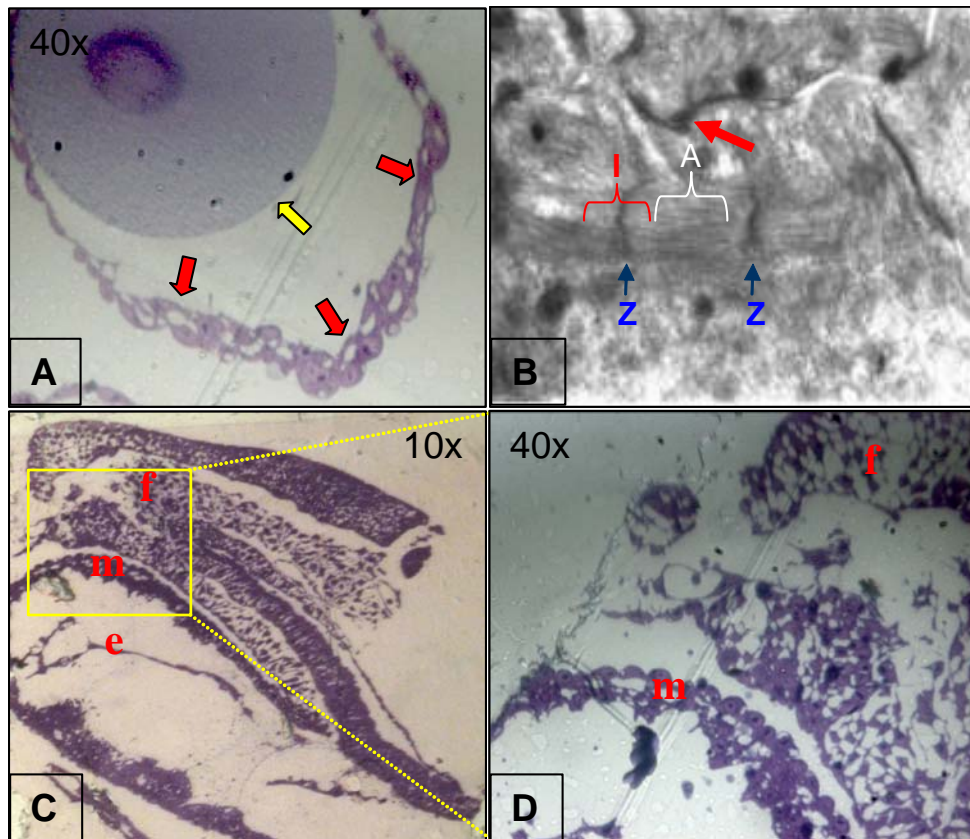


Figura 28.-Morfología y ultraestructura de las células que rodean las microesferas recubiertas con dopamina.

(A, C y D) Tinción con hematoxilina-eosina de cortes semifinos de un embrión de St11 al que se le implantó una microesfera recubierta con dopamina en St5. (A) Sección de la microesfera. Las flechas rojas señalan las células que rodean la microesfera (flecha amarilla). (B) Foto con microscopio electrónico de transmisión de una de las células que rodean la microesfera con dopamina. Las flechas azules señalan los discos Z dentro de las sarcómeras. Se muestran delimitadas con corchetes una banda A (blanco) y una banda I (rojo). La flecha roja señala un desmosoma. (C) Sección sagital de embrión de pollo de St10-11. (D) Ampliación 40X al nivel que se indica con un rectángulo amarillo en C. m: miocardio; e: endocardio; f: tejido faríngeo.

13.-El efecto de la L-DOPA es región y estadio-dependiente.

Para analizar si existía regionalización en la *Hfr* respecto a la acción de la cTH, implantamos microesferas impregnadas en L-DOPA dentro de la *Hfr* de embriones de St5 (**Fig. 29A**). En este caso no se observó expresión ectópica de los marcadores cardíacos AMHC-1, VMHC-1 y MF20 (**Fig. 29A**), a diferencia de lo obtenido cuando las microesferas se implantaron lateralmente a la *Hfr* (**Fig. 27**).

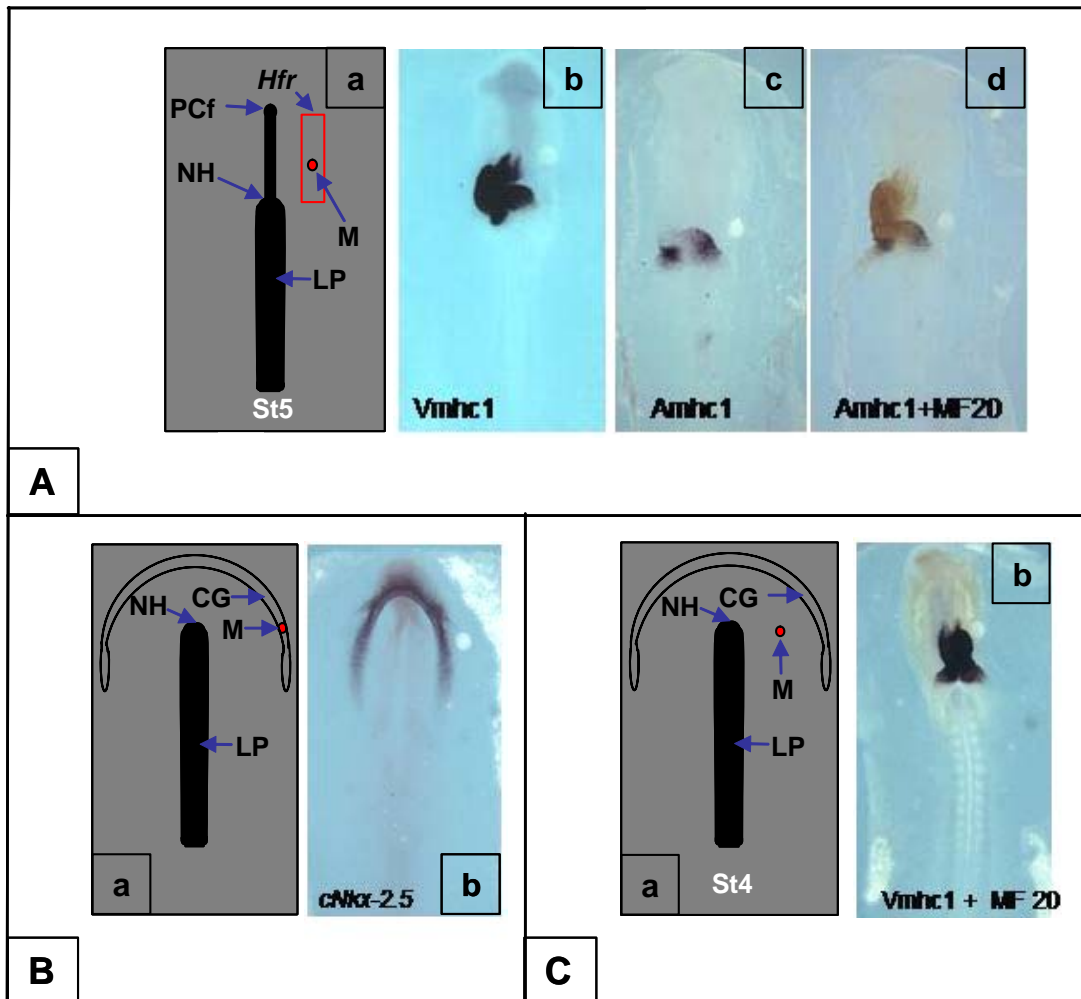


Figura 29.-El efecto de L-DOPA es específico de la región y estadio embrionario.

(A **panel a**) Diagrama de embrión de pollo de St5 donde se indica la posición de la *Hfr* mediante un rectángulo rojo y la de la microesfera (M) en el momento de su implantación. Los embriones fueron analizados en St10-11 mediante hibridación *in situ* en embrión completo para VMHC-1 (A **panel b**), AMHC-1 (A **panel c**), y doble hibridación para AMHC-1 e inmunohistoquímica para MF20 (A **panel d**). (B **panel a**) Diagrama de embrión de pollo de St4 donde se indica la posición de la microesfera en el momento de su implantación en la cresta germinal (CG). Los embriones fueron analizados en St8 mediante hibridación *in situ* para cNkx2.5 (B **panel b**).

(C **panel a**) Diagrama de embrión de pollo de St4 donde se indica la posición de la microesfera en el momento de su implantación lateral al Nódulo de Hensen (NH). Los embriones fueron analizados en St10 mediante doble hibridación para VMHC-1 e inmunohistoquímica para MF20 (C **panel b**).

LP: línea primitiva; PCf: proceso cefálico.

Para comprobar si la L-DOPA tenía efecto en la inducción de marcadores cardíacos fuera de las regiones precardiogénicas, se implantaron microesferas en embriones en St4, previamente a la formación de la *Hfr*. Las microesferas aplicadas en el interior de las crestas germinales de St4 no indujeron la expresión ectópica de Nkx2.5 (Fig. 29B **panel b**). Tampoco se observó inducción de los marcadores cardíacos

VMHC-1 y MF20, cuando las microesferas se implantaron en posición lateral al Nódulo de Hensen en St4 (**Fig. 29C panel b**).

Estos resultados sugieren que la acción inductora de la L-DOPA está restringida a las células presentes en una posición lateral con respecto a la *Hfr*.

14.-Efecto de la inhibición de la producción endógena de L-DOPA y dopamina.

Los experimentos descritos hasta ahora muestran la capacidad inductora de cardiogénesis de la L-DOPA y la dopamina aplicadas exógenamente. Con el fin de demostrar que la L-DOPA y/o la dopamina endógenas están implicadas en los pasos iniciales del desarrollo del corazón, se bloquearon farmacológicamente las enzimas encargadas de su síntesis.

Se aplicaron microesferas impregnadas en 3-yodotirosina (3-I-Tyr), un inhibidor de la TH, o en 3-hidroxibenzilhidrazina (mHBH), un inhibidor de la AADC (**Fig. 1**) dentro de la *Hfr* de embriones de St5 durante 4-8 horas. Como se muestra en la **Figura 30** la adición de 3-I-Tyr o mHBH disminuían la expresión de las miosinas cardíacas VMHC-1 (**Fig. 30 C y G**) y AMHC-1 (**Fig. 30D y H**). Sin embargo, la expresión de Tbx5, no se vio alterada con ninguno de los dos inhibidores (**Fig. 30B y F**). Este efecto inhibitorio se revertía a tiempos más largos de incubación (más de 12 horas).

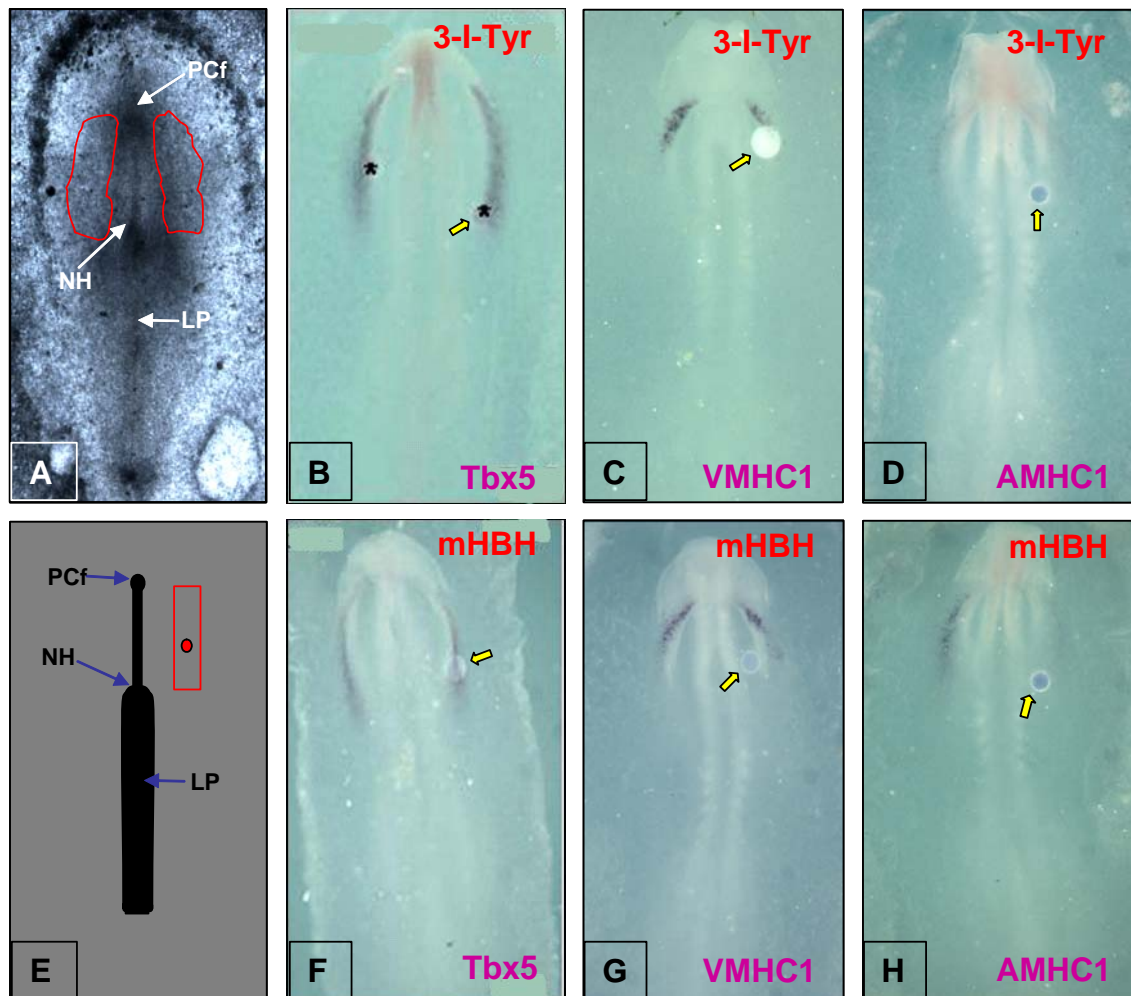


Figura 30.-Efecto de la inhibición de la L-DOPA o la dopamina endógenas.

(A) Micrografía de embrión de pollo de St5 en la que se indica rodeado en rojo, a ambos lados de la línea primitiva, la región *Hfr*. Microesferas impregnadas con 3-I-Tyr, inhibidor de la TH (B-D) o con mHBH, inhibidor de la AADC (F-H), fueron implantadas dentro de la *Hfr* de embrión de St5. Los embriones se procesaron a las 4-8 horas para hibridación *in situ* para Tbx5 (B y F), VMHC-1 (C y G) y AMHC-1 (D y H). (E) Diagrama de embrión de pollo de St5 en el que se muestra la *Hfr* mediante un rectángulo rojo y la posición de la microesfera (círculo rojo) en el momento de la implantación. Las flechas amarillas indican la posición de la microesfera dentro del embrión. LP: línea primitiva; NH: Nódulo de Hensen; PCf: proceso cefálico.

15.-Efecto de la sobreexpresión de cTH en el corazón embrionario de pollo.

Para confirmar los resultados de los estudios farmacológicos descritos anteriormente, se realizaron experimentos genéticos de ganancia de función mediante la electroporación del cDNA de la cTH. Embriones de St3 y St3+ en cultivo *EC* (apartado 2 de Materiales y Métodos) se electroporaron en la región rostral de la línea primitiva (apartado 4 de Materiales y Métodos), región por la que migran los precursores cardiacos que formarán la *Hfr* y posteriormente darán lugar al corazón (García Martínez y Schoenwolf, 1993). Tras la

electroporación, los embriones continuaron su desarrollo en cultivo durante 12-24 horas. El vector bicistrónico empleado en la electroporación (pCAGGS-cTH-STOP-IRES-GFP) contiene el cDNA de la GFP como gen reportero y el cDNA de la TH de pollo. La expresión de GFP nos permitió identificar las células electroporadas y, mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica para cTH, verificamos que el patrón de expresión de GFP y de cTH en los embriones electroporados era esencialmente idéntico (**Fig. 31**), validando así la expresión de GFP como indicativa de la expresión de cTH. Además, mediante experimentos de HPLC comprobamos que la sobreexpresión de cTH resultaba en un aumento de los niveles de L-DOPA en el embrión electroporado (**Fig. 31C**).

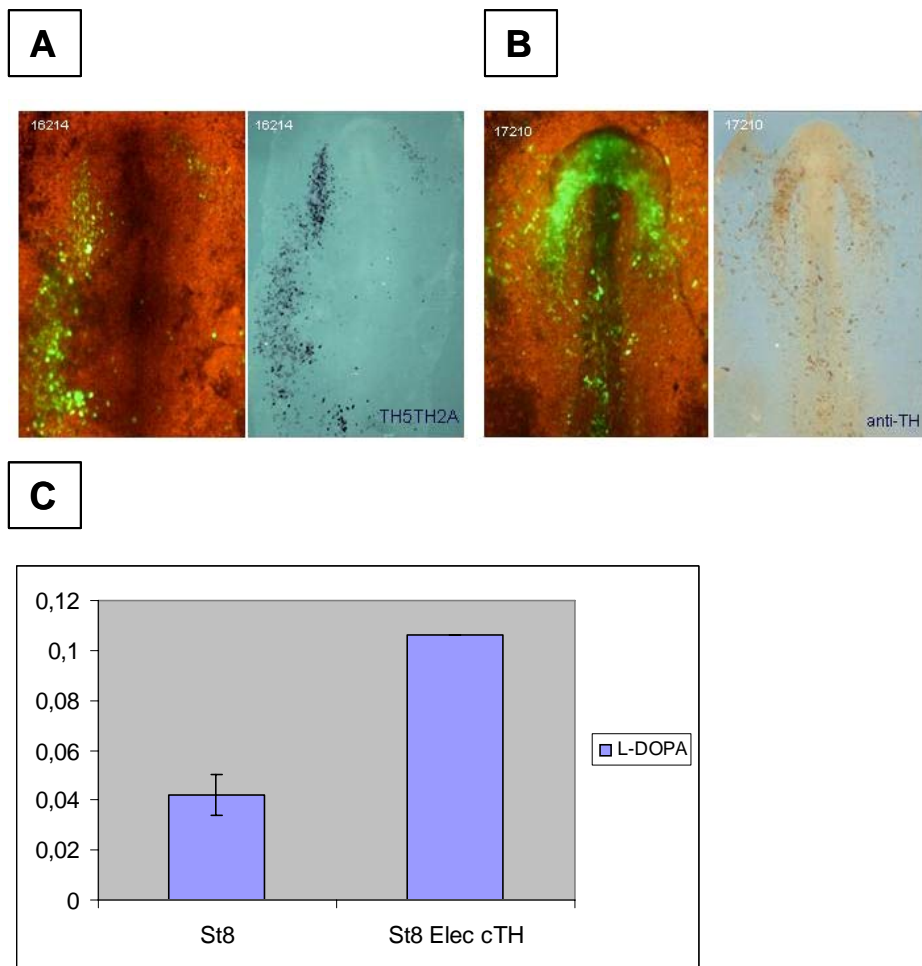


Figura 31.-El cDNA de cTH se transcribe y traduce eficientemente en las células electroporadas. Embriones de St3-St3+ en cultivo *EC* se electroporaron con el vector bicistrónico pCAGGS-cTH-STOP-IRES-GFP. **(A)** Hibridación *in situ* para cTH en embrión completo de St8. El panel de la izquierda muestra la fluorescencia de la GFP. **(B)** Inmunohistoquímica en embrión completo de St8 para cTH. La foto de la izquierda muestra la fluorescencia de la GFP. **(C)** Niveles de L-DOPA medidos por HPLC. Se muestran los datos en pmol/embrión correspondientes a la media \pm desviación estándar de dos conjuntos de 30 embriones cada uno para St8, y los niveles de un grupo de 6 embriones de St8 electroporados con el cDNA de la cTH (St8 Elec cTH).

El análisis de los embriones electroporados mostró un aumento en los niveles de expresión de las miosinas cardíacas VMHC-1 y AMHC-1, en el corazón de los embriones electroporados, con el vector pCAGGS-cTH-STOP-IRES-GFP, respecto a embriones no electroporados o a embriones electroporados con el vector pCAGGS-STOP-IRES-GFP que no contiene el cDNA de la cTH (**Fig. 32**). Además, se observó cierta expansión rostral de la expresión de AMHC-1 (flecha amarilla en **Fig. 32I**). Este efecto no era consecuencia de la electroporación, ya que no se detectaron cambios en los niveles de expresión de VMHC-1 ni de AMHC-1 entre embriones electroporados con el vector pCAGGS-STOP-IRES-GFP y embriones no electroporados (para VMHC-1 comparar **Fig. 32B** y **Fig. 32E**, y para AMHC-1 comparar **Fig. 32G** y **Fig. 32J**). A pesar de la presencia de células electroporadas fuera del asa cardíaca, no se detectó expresión de VMHC-1 ni de AMHC-1 fuera del corazón.

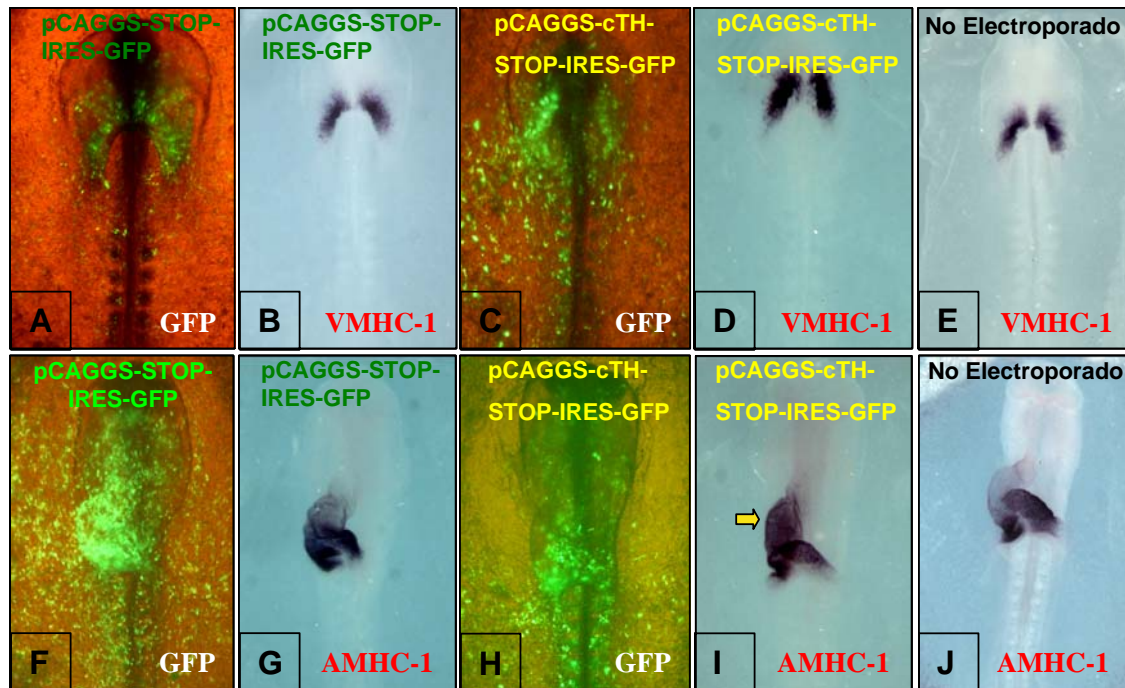


Figura 32.- Efecto de la sobreexpresión del cDNA de cTH.

Los embriones en St3 se electroporaron con el vector control pCAGGS-STOP-IRES-GFP (**A, B, F y G**) o con el vector que sobreexpresa cTH, pCAGGS-cTH-STOP-IRES-GFP (**C, D, H, I**). Hibridación *in situ* para VMHC-1 en embriones de St8 (**B, D y E**). Hibridación *in situ* para AMHC-1 en embriones de St11 (**G, I, J**). **A, C, F y H** muestran la fluorescencia de la GFP en los embriones electroporados.

Cada serie horizontal está hecha en el mismo experimento y es por tanto comparable. Entre experimentos puede haber variación de intensidad de señal tras la hibridación *in situ* para el mismo marcador.

La flecha amarilla en **I** indica expansión de la regionalización de AMHC-1.

16.-Efecto del bloqueo de la expresión endógena de cTH mediado por morfolinós.

Los experimentos con inhibidores farmacológicos de la producción de L-DOPA y dopamina están limitados a tiempos cortos (4-8 horas) ya que su efecto se revierte a las 12 horas. Para conseguir un bloqueo mantenido de la cTH endógena se diseñó un morfolino antisentido dirigido contra el inicio de la traducción del mRNA de cTH. El morfolino contra la cTH se electroporó en embriones de St3-St3+ como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Como control negativo se electroporó un morfolino contra la luciferasa, gen que no se expresa en el pollo. Ambos morfolinós están marcados con fluoresceína, lo que nos permitió identificar las células que habían incorporado el oligonucleótido. Los embriones electroporados con el morfolino contra cTH presentaban expresión reducida de AMHC-1 (comparar **Fig. 33I** y **Fig. 33G**) y VMHC-1 (comparar **Fig. 33D** y **Fig. 33B**). Sin embargo, los embriones electroporados con el morfolino contra luciferasa no presentaban cambios en los niveles de AMHC-1 ni de VMHC-1, respecto a los no electroporados (comparar **Fig. 33G** y **Fig. 33J**; **Fig. 33B** y **Fig. 33E**).

En conjunto, los resultados de los experimentos farmacológicos y genéticos indican que la cTH está implicada en la diferenciación cardíaca y es necesaria su expresión para un correcto desarrollo del corazón.

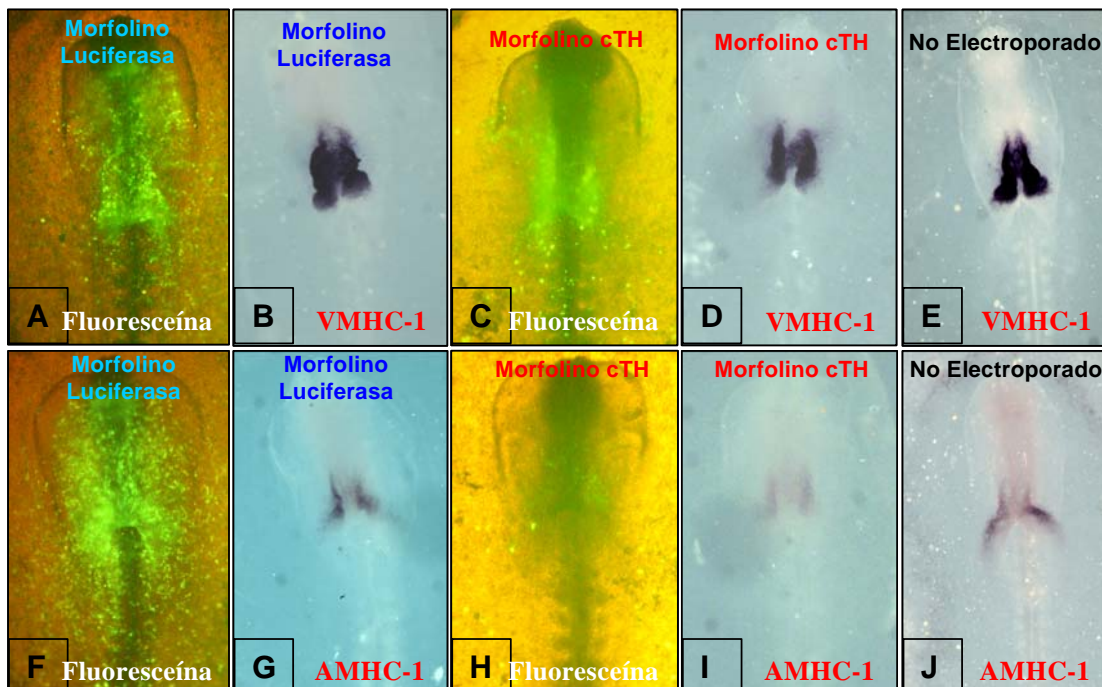


Figura 33. Efecto de la electroporación de morfolinós.

Los embriones en St3 se electroporaron con el morfolino control contra luciferasa (A, B, F y G) o con el morfolino contra cTH (C, D, H e I). Hibridación *in situ* para VMHC-1 en embriones de St10 (B, D y E). Hibridación *in situ* para AMHC-1 en embriones de St9 (G, I, J). A, C, F y H muestran la fluorescencia del morfolino en los embriones electroporados.

Cada serie horizontal está hecha en el mismo experimento y es por tanto comparable. Entre experimentos puede haber variación de intensidad de señal tras la hibridación *in situ* para el mismo marcador.

17.-Análisis de la expresión de *TH* en embriones de otras especies.

17.1.-Estudio de la expresión de la *mTH* en el embrión de ratón.

Se analizó la expresión del mRNA de mTH en el embrión completo de ratón desde gastrulación (E6,5) hasta el principio de la organogénesis (E9,5), mediante RT-PCR.

Como se muestra en la **Figura 34**, se detectó el mRNA de mTH desde E6,5, equivalente a un embrión de St4 de pollo, en adelante. Esta expresión es previa a la reportada en la literatura en embriones de E8,5 (Zhou y cols., 1995).



Figura 34.-Detección del mRNA de mTH por RT-PCR.

Expresión del mRNA de mTH, analizada por RT-PCR, en embriones completos de ratón de E6,5, E7,5, E8,5 y E9,5. Como control negativo de la PCR se utilizó H₂O.

Para comprobar si la expresión del mRNA de mTH se correspondía con la presencia de L-DOPA y dopamina en el embrión, se midieron los niveles de éstas por HPLC en embriones completos de E7,5, E8,5 y E9,5. Como se muestra en las **Figuras 35 A y B**, se detectaron tanto L-DOPA como dopamina desde E7,5, y los niveles de ambas aumentaron conforme avanza el desarrollo embrionario.

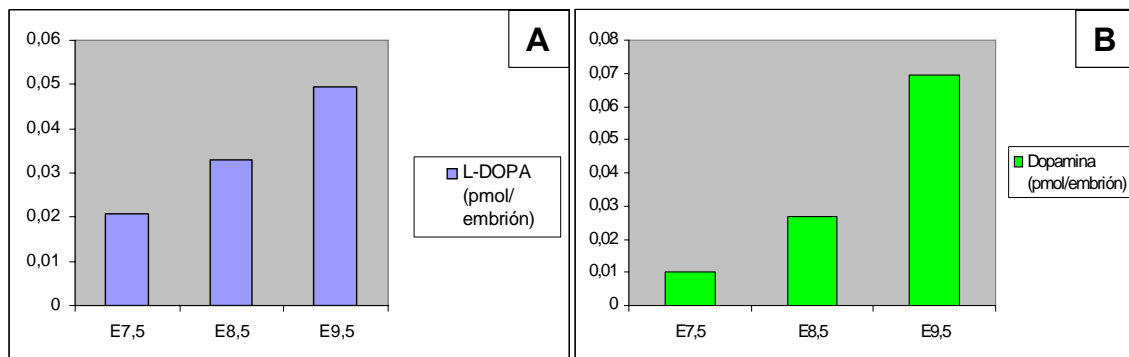


Figura 35.-Detección de L-DOPA y dopamina por HPLC en embriones de ratón.

Representación gráfica de los niveles de L-DOPA (**A**) y dopamina (**B**) en embriones completos de ratón de E7,5, E8,5 y E9,5. Se representan los datos en pmol/embrión.

Estos resultados indican que, al igual que en el pollo, la TH se expresa en el embrión de ratón desde la etapa de gastrulación. Sin embargo, no se obtuvo señal específica en experimentos de hibridación *in situ* en embriones completos de ratón de E7,5, E9,5 y E10,5. La misma ribosonda dio hibridación positiva en la *Substantia nigra* en secciones de cerebro de ratón adulto, confirmando que la sonda era adecuada, por lo que la falta de señal en los embriones analizados se atribuye a que los niveles de mRNA de mTH están por debajo de la sensibilidad de la hibridación *in situ*. En estadios posteriores (E13,5), encontramos expresión de la proteína en una área entre la vena cava y la aurícula derecha que anatómicamente se corresponde con el nodo sinoauricular (NSA) (**Fig. 36**), el marcapasos del corazón donde se origina el impulso eléctrico.

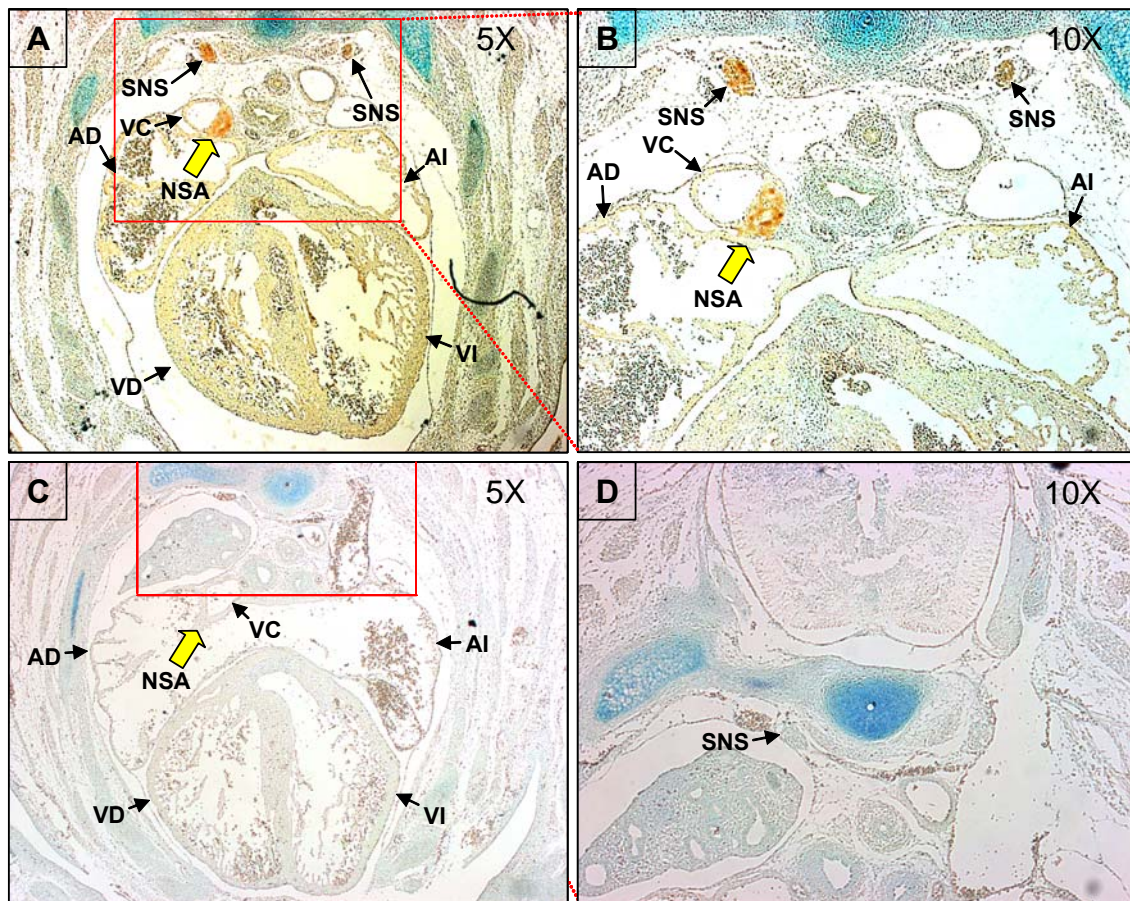


Figura 36.- Expresión de la proteína mTH en corazón de ratón de E13,5.

(A y B) Inmunohistoquímica de mTH en secciones transversales de corazón de ratón de E13,5. Las flechas amarillas señalan el nodo sinoauricular (NSA). (C y D) Control negativo de la inmunohistoquímica. B y D son ampliaciones de las regiones representadas con un rectángulo rojo en A y C.

AD: aurícula derecha; AI: aurícula izquierda; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo; VC: vena cava; NSA: nodo sinoauricular; SNS: sistema nervioso simpático.

17.2.-Estudio de la expresión de *xTH* en el embrión de *Xenopus laevis*.

Mediante RT-PCR, analizamos la expresión de *xTH* en estadios NF 11, NF 14 y NF 19, previos a la formación del tubo cardíaco (NF 31-33). Aunque débilmente, se detectó el transcrito de *xTH* desde NF 14 y claramente en NF 19 (**Fig. 37**), estadios entre la especificación cardíaca (NF 12-14, equivalente a St5 de pollo y E6,5 de ratón) y la migración de los progenitores cardíacos hacia la línea media ventral (NF 26-28, equivalente a St7 de pollo y E7,5 de ratón) (Warkman y Krieg, 2007).

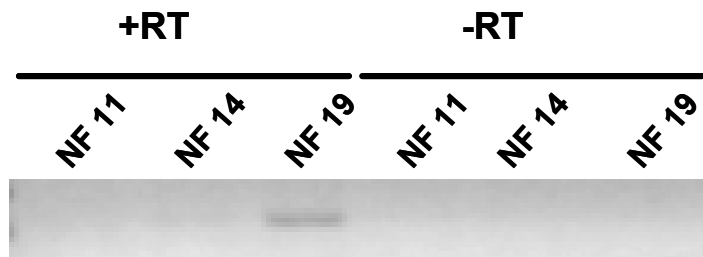


Figura 37.-Expresión de *xTH* en embriones de *Xenopus laevis*.

RT-PCR de mRNA de embriones completos de *Xenopus laevis* de estadios NF 11, NF 14 y NF 19. Como control negativo se muestra la PCR realizada a partir de RT a las que no se añadió la transcriptasa reversa (-RT).

También analizamos los niveles de L-DOPA y dopamina en embriones completos de estadios NF 10, NF 12, NF 15, NF 19, NF 20, NF 21 y NF 22, por HPLC. Se encontró L-DOPA desde estadio NF 10 (**Fig. 38A**), estadio previo a la gastrulación, y dopamina desde estadio NF 12 (**Fig. 38B**), estadio en el cual se está produciendo la especificación cardíaca (Lohr y Yost, 2000; Warkman y Krieg, 2007).

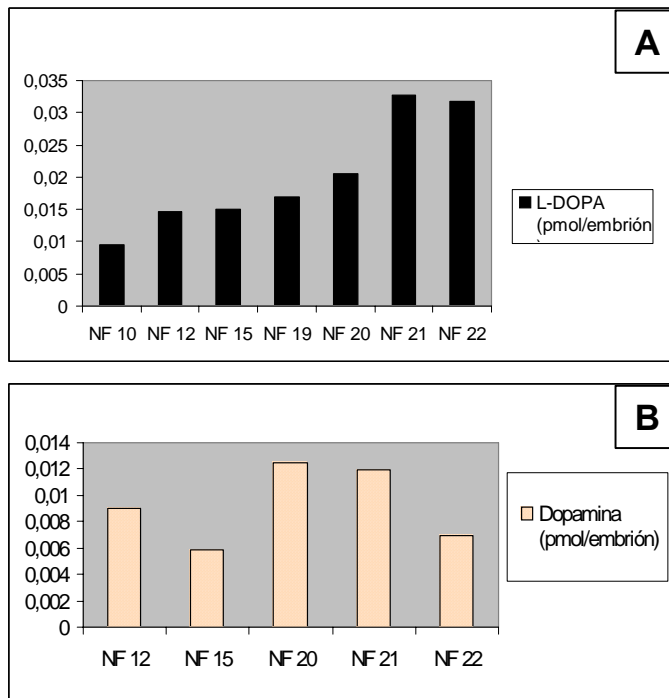


Figura 38.-Detección de L-DOPA y dopamina en embriones de *Xenopus laevis*.

Representación gráfica de los niveles de L-DOPA (A) y dopamina (B), cuantificados mediante HPLC. Los datos se muestran en pmol/embrión.

18.-Células troncales: efecto de la L-DOPA y de la dopamina sobre la expresión de marcadores cardíacos.

Con el fin de utilizar un modelo *in vitro* que nos facilitase el eventual estudio del mecanismo de acción de la L-DOPA y de la dopamina sobre el desarrollo cardíaco, se analizó el efecto de estas moléculas en células troncales de ratón durante el proceso de diferenciación a cardiomiocitos.

Las células troncales poseen la potencialidad de diferenciarse a cualquier tipo de tejido embrionario. Utilizando diferentes técnicas de diferenciación, se ha conseguido que den lugar a neuronas, cardiomiocitos y otros tipos celulares. En nuestros estudios hemos utilizado la línea de células troncales de ratón E14Tg2a.IV (E14). Como se describe en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos, las células E14 cultivadas por el método de “gota colgante” forman cuerpos embrionarios (CE), que poseen una representación de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Estos CE, tras el plaqueo sobre una superficie adherente, presentan áreas de latido. Para analizar el efecto de la cTH en la diferenciación cardíaca, los CE se trataron con 10 μ M de L-DOPA o dopamina en el día del plaqueo (día 5 de experimento, **Fig. 8** y apartado 9 de Materiales y Métodos), durante 5 días,

renovando diariamente 200 μ l de los 270 μ l del medio de cultivo. Durante el cultivo no se observaron diferencias entre los CE controles o los tratados con L-DOPA o dopamina en el número de CE con áreas de latido, ni en el momento de su aparición (**Fig. 39**). Sin embargo, el análisis de los niveles de expresión de factores de transcripción y proteínas contráctiles cardíacas mostró una estimulación en varios de ellos. Así, el tratamiento con dopamina aumentó la expresión de los factores de transcripción Nkx2.5, GATA4 y Tbx5 siendo más notable en el caso de Nkx2.5. La L-DOPA también incrementó los niveles de Nkx2.5 y GATA4 (**Fig. 40**). Además, se observó un aumento en la expresión de proteínas contráctiles como α MHC y TT2 (**Fig. 40**). Ni L-DOPA ni dopamina estimularon la expresión del factor de transcripción mesodérmico MEF2C.

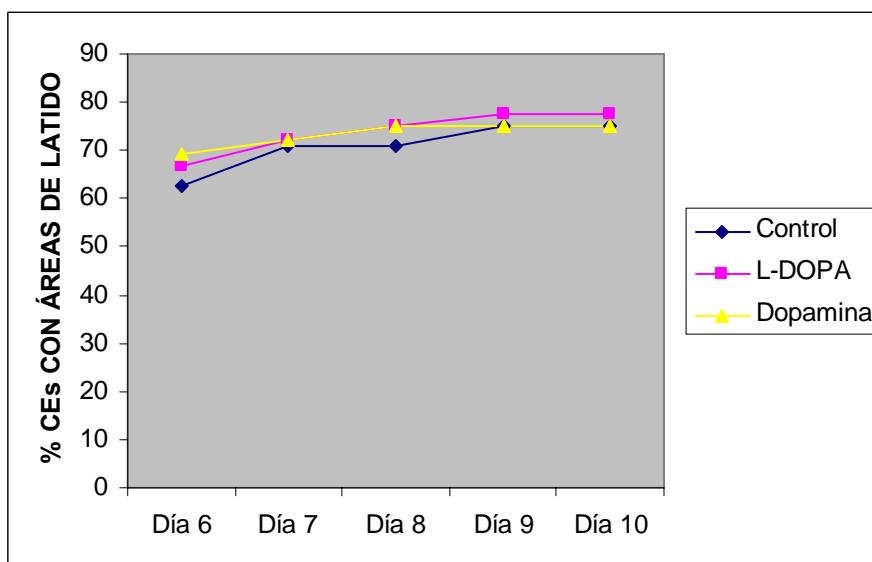


Figura 39.-Efecto de la L-DOPA y la dopamina en la aparición de las áreas de latido.

Gráfica del porcentaje de CE con áreas de latido tras el tratamiento con L-DOPA, dopamina o agua (control), desde el día 6 de experimento.

Se muestran datos correspondientes a un experimento representativo de 5.

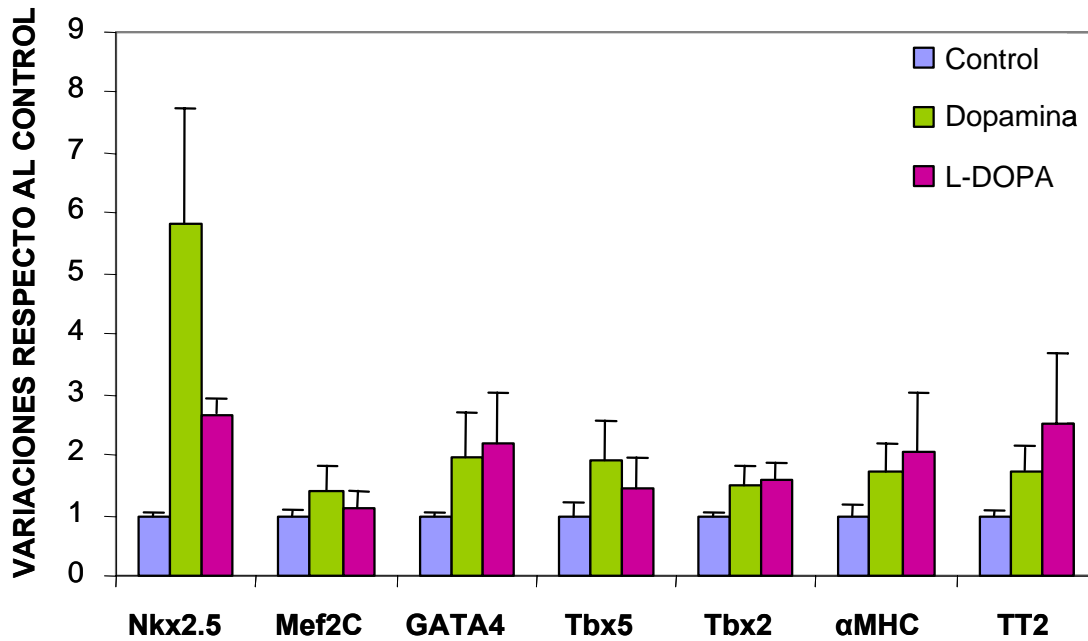


Figura 40.-La L-DOPA y la dopamina inducen la expresión de marcadores cardíacos.

RT-qPCR de RNA de CE de células E14: todos los CE del mismo tratamiento se procesaron para extracción de RNA seguida de RT-qPCR. Representación gráfica de los niveles de expresión de los mRNA de Nkx2.5, Mef2c, GATA4, Tbx5, Tbx2, αMHC y TT2 tras el tratamiento con L-DOPA o dopamina. Todos los valores se muestran corregidos por los niveles del 18S rRNA y relativizados con respecto al control al que se le adjudicó el valor 1. Se muestra la media de 3 experimentos realizados por triplicado más la desviación estándar de la media.

Seguidamente, analizamos si los CE expresaban endógenamente el gen de la *mTH*. El transcrito de *mTH* se detectó en las células troncales proliferativas (CT) y en los CE, y los niveles de mRNA de *mTH* aumentaron durante la diferenciación (**Fig. 41**) (comparar CE 5 y 10 días de diferenciación). Mediante inmunohistoquímica analizamos la expresión de *mTH* en los CE de día 8 de experimento, y en paralelo teñimos con faloidina fluorescente los filamentos de actina. Esta tinción se hace más patente en células con alto contenido en actina, como es el caso de los cardiomiocitos. Como se muestra en la **Figura 42**, tanto los CE controles como los tratados con L-DOPA o dopamina presentaban amplias áreas de expresión de *mTH* que sólo parcialmente coincidían con el marcaje con faloidina. Estos resultados indican que la expresión de *mTH* aumenta durante el proceso de diferenciación de los CE, aunque sólo una pequeña porción de las células que expresaban *mTH* eran cardiomiocitos, como se puso de manifiesto por la tinción con faloidina.

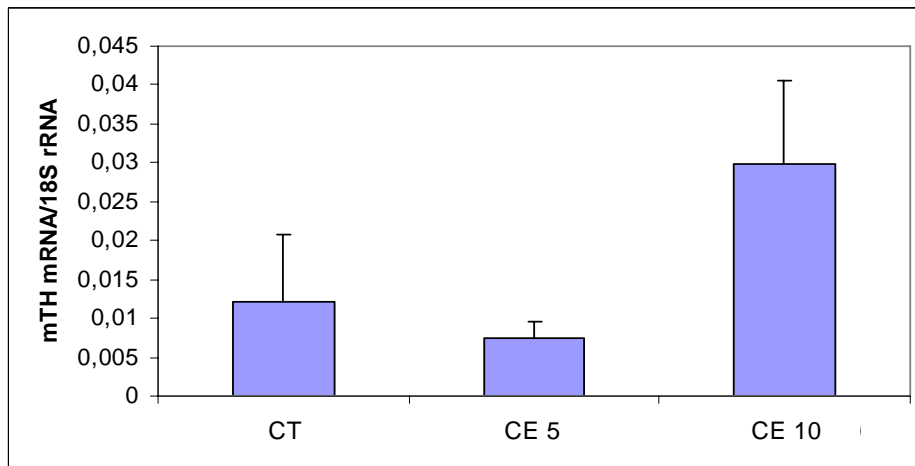


Figura 41.- Expresión del mRNA de mTH durante la diferenciación cardíaca de las células E14.
RT-qPCR de RNA de células troncales no diferenciadas (CT), cuerpos embrionarios en el día 5 de la diferenciación (CE5) y cuerpos embrionarios en el día 10 de la diferenciación (CE10). Los resultados muestran la media más la desviación estándar de 4 experimentos.

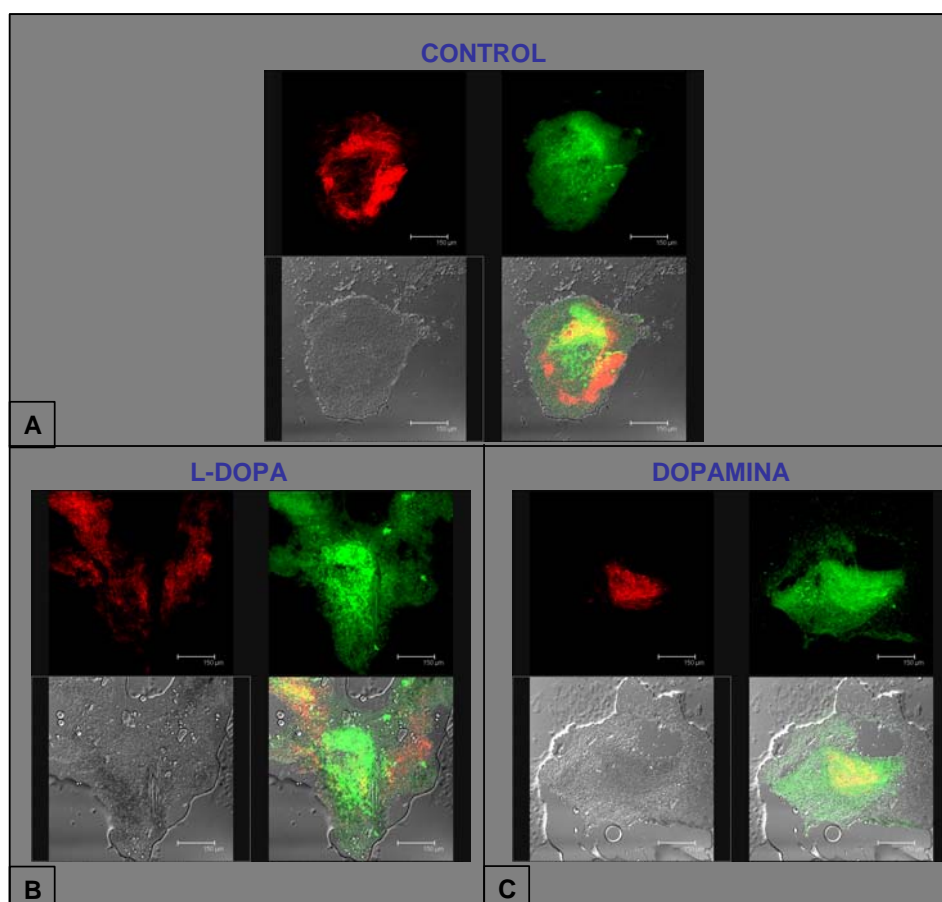


Figura 42.-Expresión de mTH en cuerpos embrionarios de la línea E14.
Detección de mTH mediante inmunohistoquímica fluorescente en un CE control (A), CE con L-DOPA (B) y un CE con dopamina (C) en el día 8 de experimento.
(A, B y C) Los cuatro paneles muestran tinción con faloidina (rojo), inmunofluorescencia para mTH (verde), foto con luz visible del CE (foto inferior izquierda) y superposición de foto con luz visible, faloidina y mTH (foto inferior derecha).

19.-Células troncales: efecto de la L-DOPA y la dopamina sobre la diferenciación hacia el linaje eritrocítico.

Durante el proceso de diferenciación a cardiomiocitos de la línea E14, se observó la aparición de eritrocitos en aproximadamente el 60% de los CE diferenciados en condiciones control (sin L-DOPA o dopamina) (Fig. 43 y Fig. 44), y su presencia no dependía de si el CE presentaba áreas de latido o no. Sin embargo, ninguno de los CE diferenciados en presencia de L-DOPA o dopamina contenía eritrocitos (Fig. 43 y Fig. 44).

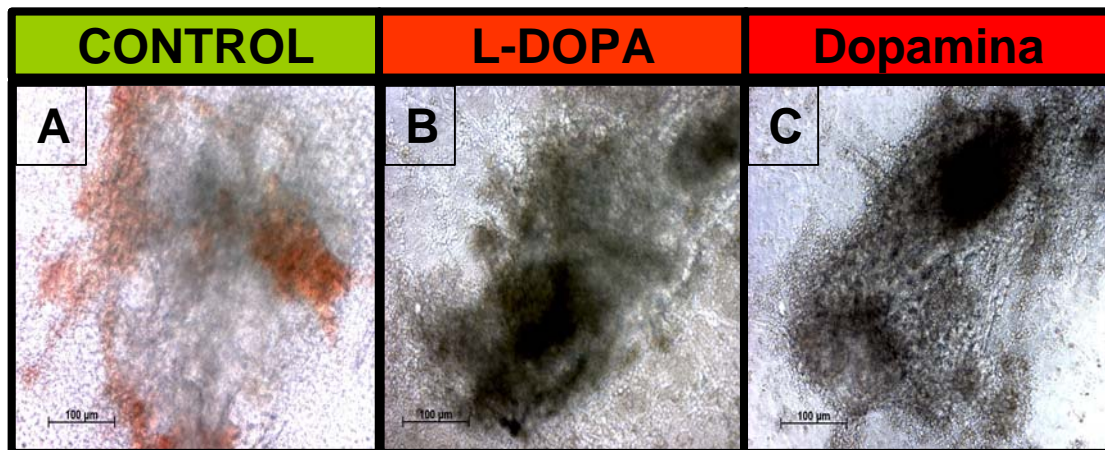


Figura 43.-Ausencia de eritrocitos en los CE de E14 tratados con L-DOPA o dopamina.

Fotos de un CE control (A), tratado con L-DOPA (B) o con dopamina (C) tomadas al final del experimento (día 10).

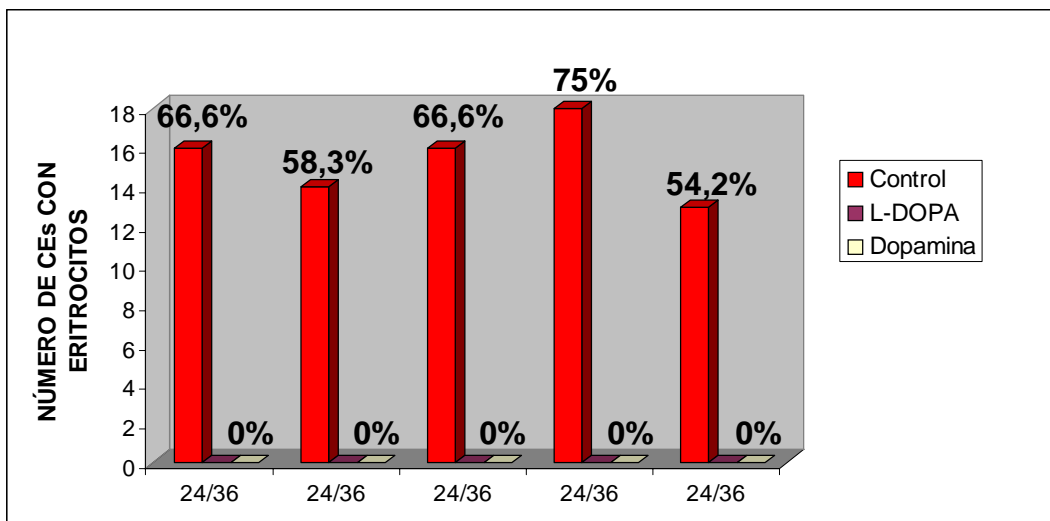


Figura 44.-Cuantificación del número de CE en los que se detectó presencia de eritrocitos.

Representación del número y porcentaje de CE controles, tratados con L-DOPA o dopamina, que presentaban eritrocitos el día 10 del experimento. En el eje de abscisas se muestra el número de CE analizados en cada experimento, que fue de 24 para los controles, y 36 para los tratados con L-DOPA o dopamina. Se determinó la presencia de eritrocitos por la aparición de células con coloración rojiza dentro del CE.

Esta observación se confirmó cuando se midieron mediante RT-qPCR los niveles del mRNA de la globina beta adulta (β Globin) y los de la globina beta embrionaria (β H1) (**Fig. 45**). Además, analizamos la expresión de otros genes del linaje hematopoyético como *SCL*, *Runx1*, *CD34* y genes de linaje endotelial (*FLK1* y *CD31*). Se observó un aumento en la expresión de *Runx1* y una disminución de los niveles de *SCL*, en respuesta a la adición de L-DOPA y dopamina, mientras que en los otros marcadores no se observaron variaciones. Aunque harán falta más experimentos para determinar el papel específico de L-DOPA y dopamina en la hematopoyesis, estos resultados sugieren que ambas moléculas podrían estar implicadas en este proceso.

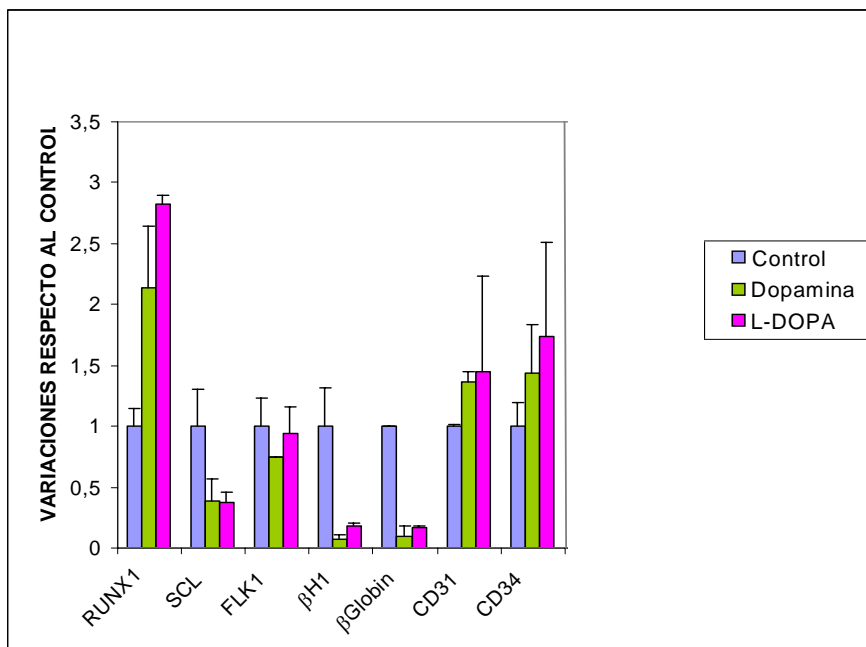


Figura 45.-Efecto de la L-DOPA y la dopamina en la hematopoyesis.

El tratamiento con L-DOPA y dopamina se realizó en los CE durante 5 días desde el día del plaqueo de los mismos (día 5). Representación de los niveles de expresión de los mRNAs de *Runx1*, *SCL*, *Flk1*, β H1, *β Globin*, *CD31* y *CD34* tras el tratamiento con L-DOPA o dopamina. Todos los valores se muestran corregidos por los niveles del 18S rRNA y relativizados con respecto al control al que se le dio el valor 1. Los resultados muestran la media más la desviación estándar de 3 experimentos.

V.-DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral se caracteriza por primera vez la presencia de transcritos quimera en embriones de pollo y codorniz, generados a partir de dos genes independientes, el gen de la *TH* y el de la *insulina*. Las proteínas generadas por los transcritos quimera son nuevas isoformas de la TH, que poseen menor actividad enzimática que la TH canónica.

En este trabajo también se muestra la expresión del gen de la *cTH* desde los estadios iniciales del desarrollo embrionario del corazón de pollo, previos al establecimiento de las conexiones nerviosas. Además, se pone de manifiesto una función totalmente nueva de la L-DOPA y la dopamina en la diferenciación de las células cardíacas.

1.-Los transcritos quimera TH-INS1 y TH-INS2, una regulación inusual.

Los transcritos quimera TH-INS1 y TH-INS2 formados por la fusión del mRNA de la TH y el de la insulina, comparten la misma secuencia de TH (los 12 primeros exones y la parte 5' del exón 13) pero difieren en la secuencia de insulina que contienen; el TH-INS1 contiene los exones 2 y 3 mientras que el TH-INS2 sólo el exón 3 de la insulina (**Fig. 11**). En la formación de ambas quimeras se excluye el codón de terminación de la traducción de la TH, de tal forma que el marco de lectura de la TH se prolonga con el de la insulina, aunque no mantiene la fase de lectura con éste. Las dos nuevas isoformas de TH generadas a partir de los transcritos quimera comparten el dominio regulador y catalítico con la TH canónica, pero carecen de los últimos 16 aminoácidos del extremo C-Terminal. La diferencia en el dominio de tetramerización podría ser la causante de que ambas isoformas presenten entre 6-7 veces menos actividad enzimática que la TH canónica. Experimentos previos por Vrana y colaboradores (1994) apoyan esta posibilidad, ya que observaron que la ausencia de la cremallera de leucinas del dominio de tetramerización no permite la oligomerización de la proteína y disminuye en gran medida su actividad enzimática. Además, los niveles de la proteína TH-INS1 en células transfectadas son significativamente inferiores a los de las proteínas TH-INS2 y TH, debido a una mayor tasa de degradación. La inestabilidad de la isoforma TH-INS1 podría ser debida a la extensión de 67 aminoácidos en el dominio C-Terminal, ya que ésta es la principal diferencia respecto a la TH canónica y única respecto a la TH-INS2. Aunque la comparación de esta secuencia con diferentes bases de datos no dio homología con ninguna proteína conocida, es posible que en estos 67 aa exista alguna secuencia de reconocimiento por la maquinaria de degradación de

proteínas, o bien la estructura secundaria generada por esta secuencia de lugar a un plegamiento anómalo de la proteína que provocaría su rápida degradación.

El transcrito quimera TH-INS1 contiene también el marco de lectura de la insulina, solapante con el de la TH. En células trasfectadas, este transcrito quimera produce bajos pero detectables niveles de proinsulina (Hernández-Sánchez y cols., 2006 (referencia 92), por lo que también podría ser considerado como un transcrito bicistrónico.

El transcrito TH-INS1, la quimera más abundante, se detecta desde gastrulación (St4), y sus niveles aumentan entre gastrulación y neurulación (St8) (**Fig. 13**). El análisis de la abundancia relativa del transcrito TH-INS1 respecto al mRNA de TH y de insulina muestra que su proporción varía dependiendo del tejido (**Fig. 14**). Estos resultados indican que los mRNA quimeras no son consecuencia de errores accidentales en la terminación de la transcripción del gen de la *TH*. Es de esperar que tales errores sean eventos estocásticos no regulados. Por el contrario, los niveles de expresión del transcrito TH-INS1 están regulados en el desarrollo y son tejido-específicos. Además, los niveles del mRNA de TH-INS1 en el embrión en neurulación son 3,5 veces superiores a los encontrados en la *Substantia nigra*, a pesar de que los niveles de mRNA de TH totales en el embrión St8 son 5,3 veces inferiores a los de la *Substantia nigra* (**Fig. 15**). Este resultado rebate que las quimeras se originen por error transcripcional, hipótesis que sería apoyada en el caso de encontrar mayor proporción de quimeras en los tejidos donde el gen situado 5' (*TH*) fuese más activo (como en la *Substantia nigra*).

Hay dos posibles mecanismos en el origen de los transcritos quimera. Por una parte, se ha sugerido que las quimeras son consecuencia de una transcripción continua del gen situado 5', que ocurre de forma regulada como es el caso de muchos virus (Pachl y Young, 1976; Masters y Samuel, 1984). Alternativamente, el mRNA quimera se podría haber originado por el procesamiento en *trans* entre los pre-mRNA individuales de cada gen, como ocurre en nemátodos y en algunos casos de mamíferos (Sullivan y cols., 1991; Nilsen, 1989; Li y cols., 1999; Fischer and cols., 2008). Hay varios hechos que, en nuestra opinión, favorecen la hipótesis de la transcripción continuada en la generación de las quimeras TH-INS1 y 2: i) los genes de *TH* e *insulina* se sitúan en el mismo cromosoma, en tándem y en la misma orientación; ii) la distancia intergénica es relativamente corta en vertebrados; iii) la sintenia *TH-insulina* se conserva desde invertebrados a mamíferos, hecho que hace pensar que esta disposición en tándem está sujeta a presión selectiva para la formación de las quimeras. De todas

formas, es necesario llevar a cabo experimentos específicos para descartar la hipótesis del procesamiento en *trans*.

A pesar de que la sintenia *TH-insulina* se mantiene a lo largo de la filogenia, sólo hemos podido encontrar las quimeras en otra especie avícola, la codorniz. No las hemos detectado ni en ratón ni en *Xenopus*, donde sí encontramos expresión de los transcritos individuales (datos no mostrados). Aunque estos resultados indican que la formación de quimeras TH-INS está limitada a aves, es posible que en las otras especies se restrinja a tejidos o estadios del desarrollo no analizados. Tampoco podemos descartar que los niveles de expresión estén por debajo del límite de detección de la técnica empleada o que las potenciales quimeras se constituyan de forma diferente a lo descrito para pollo y codorniz.

TH-INS1 y TH-INS2 son los primeros transcritos quimera descritos en aves generados a partir de las secuencias de dos genes endógenos. Previamente, Proux y colaboradores en 1996, habían descrito la presencia de transcritos quimera en células de neuro-retina de embrión de pollo infectadas con el retrovirus RAV-1, formadas por la secuencia de un gen vírico y la secuencia de un gen endógeno de pollo.

Aunque se requieren más experimentos para entender la relevancia fisiológica de la formación de quimeras TH-INS, nosotros hemos probado que al menos influyen en la expresión de TH y de insulina. Primero se produce una disminución en los niveles de los transcritos completos de TH e insulina, ya que una proporción de éstos pasaría a formar parte de los transcritos quimera. En el caso de la transcripción continuada, además, se restringiría la iniciación de la transcripción a nivel del promotor de la insulina. En cuanto a la proteína, los niveles de TH e insulina generados por el transcrito quimera TH-INS1 son significativamente inferiores a los producidos por los transcritos completos de TH e insulina y las isoformas TH-INS 1 y 2 presentan menor actividad enzimática que la forma canónica de TH. En conjunto, estos resultados sugieren que la generación de las quimeras TH-INS aportan un nuevo nivel de regulación transcripcional y post-transcripcional del locus *TH/insulina*. La secuenciación del genoma de diferentes especies ha puesto de manifiesto que la complejidad biológica de los organismos no reside exclusivamente en el número de genes de su genoma, sino que cambios en los mecanismos de regulación también contribuyen a la generación de complejidad y diversidad biológica.

2.-Expresión y actividad enzimática de la TH durante el desarrollo embrionario.

En los organismos postnatales, la expresión de la TH ha sido utilizada como marcador de neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas y adrenérgicas. Sin embargo, nosotros hemos visto que durante el desarrollo embrionario hay expresión del gen de la *TH* en estadios previos a la formación de neuronas (E3,5). Además de encontrar el mRNA y la proteína cTH, se detectaron L-DOPA y dopamina por HPLC (**Fig. 26**) en estadios previos al establecimiento de conexiones nerviosas simpáticas en el embrión de pollo (E5,5) (Miyakawa y cols., 2004). El mRNA de la cTH se encuentra asociado en pollo desde estadios de gastrulación a las regiones pre-cardíacas y cardíacas. En St5 (gastrulación) mediante RT-qPCR se detecta el mRNA de la cTH enriquecido en la *Hfr*. Posteriormente, en el embrión de St8, el transcrito de cTH se concentra en los primordios cardíacos (**Fig. 25**), expresión que se mantiene en St9 y St10. Desde St11 a St14, el mRNA de cTH detectado en el asa cardíaca se restringe a la región auricular (**Fig. 22E-H**). En estadios previos a St8, no hemos detectado señal específica para el mRNA de la cTH mediante hibridación *in situ*, aunque sí se detecta su presencia por RT-PCR, probablemente debido a la diferencia de sensibilidad de ambas técnicas. La expresión del mRNA de la cTH en la región cardíaca coincide ampliamente con la observada para la proteína, aunque ésta se detecta por primera vez en St9, probablemente debido al desfase entre síntesis de mRNA y de proteína. Además, entre St12 y St14, por hibridación *in situ*, hemos encontrado expresión transitoria del mRNA de cTH en la región caudal; sin embargo, no hemos observado correspondencia con la expresión de la proteína. Esta discrepancia no parece ser debida al atrapamiento no específico de la sonda utilizada en la hibridación *in situ* ya que secciones de esta región caudal muestra señal específica en el ectodermo (**Fig. 22K y L**). Una posible explicación es que el transcrito que se expresa en la región caudal produzca niveles muy bajos o no produzca proteína como es el caso del transcrito quimera TH-INS1 descrito anteriormente. En futuros experimentos se analizará la población de transcritos de cTH de esa región.

Este resultado indica que la cTH embrionaria es enzimáticamente activa, aunque no podemos descartar que parte de la L-DOPA y dopamina encontradas sean maternas, captadas por el embrión a partir de la yema del huevo (Ignarro y Shideman, 1968). En otras especies analizadas, también hemos encontrado expresión del gen de la *TH* en etapas previas a la formación del tubo cardíaco. En el embrión de *Xenopus* se observó expresión del gen de *xTH* desde la fase de neurulación (NF 14). Sin embargo, la L-

DOPA y la dopamina se detectaron desde la gastrulación (NF 10). Esto puede ser debido a que bajos niveles de mRNA de xTH (no detectables por RT-PCR) permitan la acumulación significativa de L-DOPA y dopamina o que la L-DOPA y dopamina encontradas en el embrión sean de aporte materno. Asimismo, en el embrión completo de ratón se encontró por RT-PCR el mRNA de mTH desde la gastrulación (E6,5) (**Fig. 34**), y en corazón desde E8,5 en adelante (E. Martínez-Campos, comunicación personal). Sin embargo, los repetidos intentos de caracterizar su patrón de expresión por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en estadios tempranos han sido infructuosos. Estos resultados indican que aunque haya expresión del gen de la *mTH* desde gastrulación, los niveles de mRNA y proteína mTH (si se traduce) están por debajo de la sensibilidad de dichas técnicas. Por otra parte, la L-DOPA y la dopamina se detectan en embriones completos de ratón desde E7,5 (**Fig. 35**), y en corazones embrionarios desde E8,5 (no mostrado). La L-DOPA y la dopamina encontradas en el embrión, además de ser producidas por el propio embrión, podrían al menos en parte, ser proporcionadas por la madre. De experimentos de Zhou y colaboradores (1995), sabemos que la L-DOPA atraviesa la placenta, ya que el aporte exógeno de L-DOPA a madres heterocigotas para el gen de *TH* rescata la letalidad embrionaria de los ratones nulos de *TH*.

En estadios más avanzados, cuando el corazón está tabicado (E13,5), hemos observado expresión de la proteína mTH en el nodo sinoauricular del corazón, considerado el marcapasos del corazón (**Fig. 36**).

3. -Análisis del efecto de la L-DOPA y la dopamina en el desarrollo embrionario del corazón de pollo.

La presencia de cTH desde los estadios iniciales del desarrollo del corazón, previo a la inervación simpática (posterior a E5) (Kirby y cols., 1980), indica que las catecolaminas podrían actuar de forma autocrina/paracrina en la formación del corazón. Mediante la administración exógena de L-DOPA o de dopamina, hemos demostrado que ambas inducen la expresión ectópica de diversos marcadores cardíacos, como los factores de transcripción Nkx2.5 y Tbx5 (**Fig. 27**), implicados en la diferenciación del linaje cardíaco, y las proteínas contráctiles AMHC-1 y VMHC-1 (**Fig. 27**). El análisis de la ultraestructura de las células en las que se induce esta expresión muestra una morfología similar a la de cardiomiocitos, con fibras contráctiles organizadas en sarcómeros (**Fig. 28**).

La capacidad cardio-inductora de estas moléculas sólo se observa cuando son administradas en regiones concretas del embrión, y en determinados estadios embrionarios. Así, hemos observado que la L-DOPA no tiene efecto cuando se aplica previamente al establecimiento de la *Hfr*, en las crestas germinales o en posición lateral al Nódulo de Hensen en St4. Sin embargo, FGF2 y FGF4 aplicados en las crestas germinales, sí inducen la expresión de marcadores cardíacos como *Nkx2.5* (López-Sánchez y cols., 2002). Por otro lado, en St5 sólo hay inducción cuando se aplica en posición lateral pero no dentro de la *Hfr* (**Fig. 29**). Experimentos previos muestran que el mesodermo embrionario presenta diferentes respuestas al mismo estímulo. Así, BMP2 induce la expresión de marcadores cardíacos en el mesodermo antero-medial (Schulteiss y cols., 1997), pero no en el mesodermo postero-caudal (Barron y cols., 2000).

Estos resultados sugieren que la L-DOPA tiene restringida su capacidad inductora a una subpoblación concreta de precursores con potencialidad de diferenciación cardíaca y/o su acción está condicionada a la presencia o ausencia de otras señales inductoras o inhibitorias respectivamente. Asimismo, el bloqueo de la producción endógena de L-DOPA y dopamina, mediante la administración de inhibidores de las enzimas encargadas de su síntesis, inhibe la expresión de los mRNA de las proteínas contráctiles AMHC-1 y VMHC-1 (**Fig. 30**), aunque no afecta a la expresión del mRNA del factor de transcripción Tbx5. Estos resultados sugieren que la L-DOPA y la dopamina embrionarias son necesarias para la expresión de las proteínas contráctiles, pero no son imprescindibles para la expresión de Tbx5. El efecto de la inhibición farmacológica de la actividad enzimática de la cTH endógena con 3-I-Tyr se revierte a las 8 horas del tratamiento. La inhibición también fue transitoria cuando se usó otro inhibidor de la TH, la AMPT, si bien éste en las células PC12 presenta un efecto inhibitorio más potente y prolongado que la 3-I-Tyr (resultado no mostrado).

Aunque la L-DOPA ha sido clásicamente considerada sólo un producto intermediario en la síntesis de catecolaminas (**Fig. 1**), en la retina embrionaria de ratón se ha mostrado que también tiene una función biológica independiente de las catecolaminas (Lavado y cols., 2006) y, recientemente, se ha identificado su receptor (López y cols., 2008). No obstante, nuestros resultados sugieren que en el caso del desarrollo cardíaco, la dopamina es la molécula biológicamente activa. La L-DOPA y la dopamina estimulan los mismos genes (**Fig. 27**) y, tanto la inhibición de la producción endógena de L-DOPA como la de dopamina, tienen el mismo efecto sobre la expresión

de los genes cardíacos (**Fig. 30**). Probablemente, la L-DOPA aplicada exógenamente es convertida por la AADC, enzima de expresión ubicua, en dopamina, la cual ejerce su función sobre la expresión de los marcadores cardíacos.

Los experimentos de ganancia de función mediante la sobreexpresión del cDNA de la cTH confirmaron la estimulación de la expresión de factores de transcripción y proteínas contráctiles cardíacas (**Fig. 32**). Cabe resaltar que, a pesar de haber sobreexpresión de cTH en células no integradas en el corazón de los embriones electroporados, no se observó expresión ectópica de proteínas cardíacas en estas células. Estos resultados, al igual que los de los implantes de microesferas impregnadas de L-DOPA discutidos anteriormente, indican que la cTH sólo actúa sobre ciertas células con capacidad de diferenciación a cardiomiocitos, o bien que su acción está condicionada a la presencia o ausencia de otras señales.

Los experimentos de electroporación, además, han puesto de manifiesto otra posible función de la cTH en la formación del corazón: la regulación de la regionalización. Uno de los primeros eventos en la regionalización del corazón es la especificación de los sectores auricular y ventricular, que se pone de manifiesto por la restricción de la expresión de la miosina ventricular a la región rostral del tubo y de la auricular a la región caudal (Bao y cols., 1999). La sobreexpresión de cTH que hemos inducido en embriones de pollo, expande anteriormente el territorio de expresión de AMHC-1 (**Fig. 32I**). Aunque estos resultados son preliminares, y es necesario confirmarlos con el análisis de otros marcadores, sugieren que la TH interviene en la regionalización o especificación del sector sinoauricular. Esta hipótesis también está sustentada por el patrón de expresión de la TH endógena en el embrión de pollo: a partir de St10-11 la expresión de cTH comienza a restringirse a la región caudal del tubo cardíaco (**Fig. 22D-H**) que dará lugar a la región auricular y al nodo sinoauricular. En embriones de pollo en St11, la región auricular actúa como marcapasos del corazón, función que queda relegada al nodo sinoauricular en estadios posteriores. Igualmente, en corazón de ratón de E13,5 hemos encontrado expresión de mTH específicamente en el nodo sinoauricular (**Fig. 36**). Anteriormente, Ebert y Thompson (2001) habían descrito la expresión transitoria de las enzimas de la ruta de biosíntesis de catecolaminas, en regiones que dan lugar a los nodos sinoauricular y aurículo-ventricular. Incluso, estudios recientes de linaje proponen que las células ICA (células productoras de catecolaminas) son precursoras de todos los tipos celulares del corazón (Ebert and Taylor, 2006; Ebert y cols., 2008).

En estudios preliminares de bloqueo de la expresión de cTH con morfolinós, los embriones desarrollan corazones anormales y muestran una reducción en la expresión de los mRNA de AMHC-1 y VMHC-1 (**Fig. 33**). Ante estos resultados, sorprende que el ratón nulo para el gen de *TH* no presente mayores alteraciones estructurales. Aunque no podemos descartar que esto sea debido a diferencias interespecíficas, es posible que otras moléculas estén compensando la carencia de catecolaminas en el proceso de cardiogénesis o que el aporte materno de catecolaminas supla al menos parcialmente el déficit embrionario.

A la luz de nuestros resultados, y los de otros grupos, nos atrevemos a proponer que la TH juega un papel importante en la cardiogénesis, primero permitiendo o favoreciendo la diferenciación hacia el linaje de cardiomiocitos, y posteriormente en la especificación del sistema de conducción, en particular del nodo sinoauricular. Esta hipótesis encaja con la teoría propuesta en los años 50 del siglo pasado, en la que se postulaba que en etapas tempranas del desarrollo embrionario los neurotransmisores regularían actividades morfogenéticas como proliferación, diferenciación, movilidad celular y metamorfosis. Uno de los casos más conocidos es el de la serotonina (Buznikov, 1991; Buznikov y cols., 2001).

4.-Análisis del efecto de la L-DOPA y de la dopamina en la diferenciación de células troncales.

Las células troncales se aislaron por primera vez en embriones pre-implantados de ratón (Evans y Kaufman, 1981), y tienen la propiedad de que en cultivo se diferencian a diferentes tipos celulares (Narayan y cols., 2006; Klug y cols., 1996; Laflamme y cols., 2005; Ben-Hur y cols., 2004; Keirstad y cols., 2005; Jiang y cols., 2007), que podrían ser utilizados para terapia en medicina regenerativa.

En esta Tesis Doctoral hemos analizado el efecto de la L-DOPA y de la dopamina en la diferenciación de las células troncales de ratón E14Tg2a.IV a cardiomiocitos. Mediante el método de cultivo en “gota colgante”, las células troncales forman estructuras tridimensionales denominadas CE, en los que aparece una representación celular de las tres capas embrionarias. Posteriormente, comienzan a aparecer áreas de latido (Boheler y cols., 2002). Dentro del CE coexisten cardiomiocitos con diferente grado de diferenciación, desde más indiferenciados, similares a las células “marcapaso” del corazón, a los más organizados, que se asemejan a cardiomiocitos auriculares y ventriculares (Hescheler y cols., 1997).

Aunque la L-DOPA y la dopamina no afectaron al número de CE que presentaban áreas de latido (**Fig. 39**), ni al número de áreas de latido por CE, ni a la frecuencia de latido (datos no mostrados), se observó un aumento de la expresión de los mRNA de los factores de transcripción implicados en el desarrollo cardíaco Nkx2.5, GATA4 y Tbx5. La L-DOPA y la dopamina indujeron adicionalmente la expresión de los mRNAs de las proteínas TT2 y α -MHC, implicadas en la contracción (**Fig. 40**). Además, los CE expresan endógenamente el gen de la *mTH* (**Fig. 41 y 42**), y los niveles de mRNA de *mTH* aumentan con la diferenciación, por lo que la *mTH* endógena podría estar implicada en el proceso de diferenciación cardíaca de las células troncales. De hecho, en un experimento preliminar hemos observado que el bloqueo farmacológico de la *mTH* utilizando la 3-I-Tyr, inhibe la expresión de Nkx2.5, GATA4 y Tbx5 (datos no mostrados). Estos resultados indicarían que la expresión endógena de la *mTH* en las células troncales es necesaria para la diferenciación de estas células a cardiomiocitos.

Durante el proceso de diferenciación a cardiomiocitos, en un 60% de los CE controles aparecieron de forma espontánea eritrocitos, no observándose nunca en los CE tratados con L-DOPA o dopamina (**Fig. 43 y 44**). Además, tanto la L-DOPA como la dopamina inhibieron la expresión de las globinas beta adulta y embrionaria (**Fig. 45**). Se requieren más experimentos para dilucidar la función de la L-DOPA y de la dopamina durante la hematopoyesis.

El incremento en los niveles de expresión de los mRNA de los factores de transcripción y proteínas contráctiles, así como la inhibición de los niveles de expresión de las globinas beta, es probable que sea debido exclusivamente a la acción de la L-DOPA o dopamina, y no a la interacción de las mismas con otros factores, ya que el tratamiento se realizó en medio sin suero.

La estimulación de la diferenciación de las células troncales a cardiomiocitos por la L-DOPA y por la dopamina, tiene dos implicaciones fundamentales. Por un lado, nos proporciona un sistema *in vitro*, que en gran parte recapitula el proceso de diferenciación cardíaca *in vivo*, como sistema modelo donde analizar el mecanismo de acción de estas moléculas. Además, podrían suponer un importante avance en la obtención de cardiomiocitos a partir de células troncales o de precursores de diferente origen y su posterior uso en terapia regenerativa. De hecho, parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la solicitud de una patente: “Uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos” (Solicitud España P200802422).

VI.-CONCLUSIONES

- 1.-Los transcritos quimera TH-INS1 y TH-INS2, identificados en embriones de pollo y codorniz, están formados por la secuencia de 12 de los 13 exones del gen de la *tirosina hidroxilasa* (TH) y el extremo 5' del exón 13, fusionada a la secuencia de los exones 2 y 3 del gen de la *insulina* en el TH-INS1, o la secuencia del exón 3 del gen de la *insulina* en el TH-INS2.
- 2.-Las proteínas formadas a partir de los transcritos TH-INS1 y TH-INS2 son formas truncadas de la proteína TH que, en células transfectadas, presentan una actividad enzimática 6 y 7 veces inferior al de la proteína TH canónica, respectivamente.
- 3.-La expresión del mRNA de la TH es detectada en embrión de pollo desde el St4 (gastrulación) por RT-qPCR, y desde el St8 (neurulación) por hibridación *in situ*, restringida al mesodermo esplácnico de la región cardíaca. Entre St11 y St14 la expresión se localiza específicamente en la región auricular del corazón. El mRNA de la TH también presenta una expresión transitoria en el ectodermo de la región caudal entre St12 y St14. La expresión de la proteína TH es detectada desde el St9 en el mesodermo esplácnico de la región cardíaca.
- 4.-En ratón, la expresión del mRNA de la TH también ha sido observada en embrión completo desde E6,5 (gastrulación) por RT-PCR, y la expresión de la proteína TH está presente en el corazón del E13,5, aunque restringida al nodo sinoauricular. En embriones de *Xenopus laevis*, el mRNA de la TH es detectado desde NF 19, estadio previo a la formación del tubo cardíaco.
- 5.-La L-DOPA y la dopamina administradas en embriones de pollo en cultivo, en posición lateral al *Hfr*, inducen la expresión ectópica de los marcadores cardíacos Nkx2.5, Tbx5, AMHC-1 y VMHC-1. Las células en las que se induce esta expresión presentan morfología y ultraestructura similares a cardiomiocitos.
- 6.-La inhibición de la producción endógena de L-DOPA y de dopamina en embriones de pollo, mediante el uso de inhibidores farmacológicos de las enzimas encargadas de su síntesis, inhibe la expresión de los marcadores cardíacos AMHC-1 y VMHC-1.

7.-La sobreexpresión de la TH, mediante electroporación, en células de embrión de pollo destinadas a formar parte del corazón, induce la expresión de los marcadores cardíacos AMHC-1 y VMHC-1. El bloqueo de la expresión de la TH en embriones de pollo mediante el uso de morfolidos inhibe la expresión de AMHC-1 y de VMHC-1.

8.-La L-DOPA y la dopamina inducen la expresión de los marcadores cardíacos Nkx2.5, GATA4, Tbx5, troponina T2 y α -MHC durante la diferenciación de células troncales de ratón a cardiomiocitos. La L-DOPA y la dopamina bloquean la diferenciación de las células troncales de ratón al linaje eritrocítico.

9.-En conjunto, nuestros datos aportan la primera descripción de quimerismo inducido por transcripción génica (TIC) en aves, en el locus TH-INS, y demuestran una función de la enzima TH en la cardiogénesis.

VII.-BIBLIOGRAFÍA

1. Aantaa R, Marjamaki A, Scheinin M. Molecular pharmacology of alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Ann Med.* 1995;27(4):439-449.
2. Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:45-68.
3. Albert KA, Helmer-Matyjek E, Nairn AC, Muller TH, Haycock JW, Greene LA, Goldstein M, Greengard P. Calcium/phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(24):7713-7717.
4. Alexander J, Rothenberg M, Henry GL, Stainier DY. casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. *Dev Biol.* 1999;215(2):343-357.
5. Andersson KK, Cox DD, Que L, Jr., Flatmark T, Haavik J. Resonance Raman studies on the blue-green-colored bovine adrenal tyrosine 3-monooxygenase (tyrosine hydroxylase). Evidence that the feedback inhibitors adrenaline and noradrenaline are coordinated to iron. *J Biol Chem.* 1988;263(35):18621-18626.
6. Andersson KK, Vassort C, Brennan BA, Que L, Jr., Haavik J, Flatmark T, Gros F, Thibault J. Purification and characterization of the blue-green rat pheochromocytoma (PC12) tyrosine hydroxylase with a dopamine-Fe(III) complex. Reversal of the endogenous feedback inhibition by phosphorylation of serine-40. *Biochem J.* 1992;284 (Pt 3):687-695.
7. Andree B, Duprez D, Vorbusch B, Arnold HH, Brand T. BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. *Mech Dev.* 1998;70(1-2):119-131.
8. Antin PB, Taylor RG, Yatskievych T. Precardiac mesoderm is specified during gastrulation in quail. *Dev Dyn.* 1994;200(2):144-154.
9. Azpiazu N, Frasch M. tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of Drosophila. *Genes Dev.* 1993;7(7B):1325-1340.
10. Baldini A. DiGeorge syndrome: an update. *Curr Opin Cardiol.* 2004;19(3):201-204.
11. Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. *Science.* 1999;283(5405):1161-1164.
12. Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precadial mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev Dyn.* 2000;218(2):383-393.
13. Barzilai A, Melamed E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 2003;9(3):126-132.
14. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* 1997;15(1):30-35.
15. Begemann G, Gibert Y, Meyer A, Ingham PW. Cloning of zebrafish T-box genes tbx15 and tbx18 and their expression during embryonic development. *Mech Dev.* 2002;114(1-2):137-141.
16. Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, Pera M, Reinhartz E, Itzik A, Reubinoff BE. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells.* 2004;22(7):1246-1255.

17. Biben C, Hatzistavrou T, Harvey RP. Expression of NK-2 class homeobox gene *Nkx2-6* in foregut endoderm and heart. *Mech Dev.* 1998;73(1):125-127.
18. Biederman J, Spencer T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry.* 1999;46(9):1234-1242.
19. Bisaha JG, Bader D. Identification and characterization of a ventricular-specific avian myosin heavy chain, VMHC1: expression in differentiating cardiac and skeletal muscle. *Dev Biol.* 1991;148(1):355-364.
20. Bodmer R. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development.* 1993;118(3):719-729.
21. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002;91(3):189-201.
22. Boullin J, Morgan JM. The development of cardiac rhythm. *Heart.* 2005;91(7):874-875.
23. Brown CB, Wenning JM, Lu MM, Epstein DJ, Meyers EN, Epstein JA. Cre-mediated excision of *Fgf8* in the *Tbx1* expression domain reveals a critical role for *Fgf8* in cardiovascular development in the mouse. *Dev Biol.* 2004;267(1):190-202.
24. Brown NA, Anderson RH. Symmetry and laterality in the human heart: developmental implications. In: *Heart Development, edited by Harvey RP and Rosenthal N. San Diego, CA: Academic.* 1999;chapt. 25(1):447-461.
25. Bruneau BG, Bao ZZ, Fatkin D, Xavier-Neto J, Georgakopoulos D, Maguire CT, Berul CI, Kass DA, Kuroski-de Bold ML, de Bold AJ, Conner DA, Rosenthal N, Cepko CL, Seidman CE, Seidman JG. Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol Cell Biol.* 2001;21(5):1730-1736.
26. Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, Seidman JG, Seidman CE. Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev Biol.* 2000;217(2):266-277.
27. Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE. Chamber-specific cardiac expression of *Tbx5* and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol.* 1999;211(1):100-108.
28. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell.* 2001;106(6):709-721.
29. Buchberger A, Pabst O, Brand T, Seidl K, Arnold HH. Chick *NKx-2.3* represents a novel family member of vertebrate homologues to the *Drosophila* homeobox gene *tinman*: differential expression of *cNKx-2.3* and *cNKx-2.5* during heart and gut development. *Mech Dev.* 1996;56(1-2):151-163.
30. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 2005;6(11):826-835.
31. Bussen M, Petry M, Schuster-Gossler K, Leitges M, Gossler A, Kispert A. The T-box transcription factor *Tbx18* maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev.* 2004;18(10):1209-1221.
32. Buznikov GA. The biogenic monoamines as regulators of early (pre-nervous) embryogenesis: new data. *Adv Exp Med Biol.* 1991;296:33-48.
33. Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 2001;305(2):177-186.

34. Bylund DB. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *Faseb J.* 1992;6(3):832-839.
35. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell.* 2003;5(6):877-889.
36. Canale ED, Campbell GR, Smolich JJ, Campbell JH. Cardiac Muscle. 1986;126(22):1-318.
37. Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE. Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn.* 1996;206(4):379-390.
38. Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn.* 2001;220(3):284-289.
39. Chen JN, Fishman MC. Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development.* 1996;122(12):3809-3816.
40. Chen TH, Chang TC, Kang JO, Choudhary B, Makita T, Tran CM, Burch JB, Eid H, Sucov HM. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol.* 2002;250(1):198-207.
41. Cheng G, Lichenberg WH, Cole GJ, Mikawa T, Thompson RP, Gourdie RG. Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development.* 1999;126(22):5041-5049.
42. Christoffels VM, Keijser AG, Houweling AC, Clout DE, Moorman AF. Patterning the embryonic heart: identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol.* 2000;224(2):263-274.
43. Cikos S, Rehak P, Czikkova S, Vesela J, Koppel J. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction.* 2007;133(6):1139-1147.
44. Cikos S, Vesela J, Il'kova G, Rehak P, Czikkova S, Koppel J. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 2005;71(2):145-153.
45. Coker GT, 3rd, Vinnedge L, O'Malley KL. Characterization of rat and human tyrosine hydroxylase genes: functional expression of both promoters in neuronal and non-neuronal cell types. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;157(3):1341-1347.
46. Colas JF, Lawson A, Schoenwolf GC. Evidence that translation of smooth muscle alpha-actin mRNA is delayed in the chick promyocardium until fusion of the bilateral heart-forming regions. *Dev Dyn.* 2000;218(2):316-330.
47. Cosgaya JM, Garcia-Villalba P, Perona R, Aranda A. Comparison of the effects of retinoic acid and nerve growth factor on PC12 cell proliferation, differentiation, and gene expression. *J Neurochem.* 1996;66(1):89-98.
48. Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, Bruneau BG. The homeodomain transcription factor Irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell.* 2005;123(2):347-358.
49. Crossley PH, Martin GR. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development.* 1995;121(2):439-451.

50. Daubner SC, Lohse DL, Fitzpatrick PF. Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase. *Protein Sci.* 1993;2(9):1452-1460.
51. Davis DL, Wessels A, Burch JB. An Nkx-dependent enhancer regulates cGATA-6 gene expression during early stages of heart development. *Dev Biol.* 2000;217(2):310-322.
52. Day JJ. Extracellular signal-related kinase activation during natural reward learning: a physiological role for phasic nucleus accumbens dopamine? *J Neurosci.* 2008;28(17):4295-4297.
53. De Pablo F, Roth J. Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(9):339-342.
54. De Pedro N, Alonso-Gomez AL, Gancedo B, Valenciano AI, Delgado MJ, Alonso-Bedate M. Effect of alpha-helical-CRF[9-41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav Neurosci.* 1997;111(2):398-403.
55. Dehaan RL. Migration patterns of the precardiac mesoderm in the early chick embryo. *Exp Cell Res.* 1963;29:544-560.
56. Diaz B, Pimentel B, de Pablo F, de La Rosa EJ. Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur J Neurosci.* 1999;11(5):1624-1632.
57. Diaz B, Serna J, De Pablo F, de la Rosa EJ. In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development.* 2000;127(8):1641-1649.
58. Drake CJ, Wessels A, Trusk T, Little CD. Elevated vascular endothelial cell growth factor affects mesocardial morphogenesis and inhibits normal heart bending. *Dev Dyn.* 2006;235(1):spc1.
59. Ebert SN, Rong Q, Boe S, Pfeifer K. Catecholamine-synthesizing cells in the embryonic mouse heart. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1148:317-324.
60. Ebert SN, Taylor DG. Catecholamines and development of cardiac pacemaking: an intrinsically intimate relationship. *Cardiovasc Res.* 2006;72(3):364-374.
61. Ebert SN, Thompson RP. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res.* 2001;88(1):117-124.
62. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res.* 1995;77(1):1-6.
63. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-156.
64. Evans SM. Vertebrate tinman homologues and cardiac differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(1):73-83.
65. Evans SM, Yan W, Murillo MP, Ponce J, Papalopulu N. tinman, a Drosophila homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of tinman. *Development.* 1995;121(11):3889-3899.
66. Fischer SE, Butler MD, Pan Q, Ruvkun G. Trans-splicing in *C. elegans* generates the negative RNAi regulator ERI-6/7. *Nature.* 2008;455(7212):491-496.
67. Fitzpatrick PF. The metal requirement of rat tyrosine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(1):211-215.

68. Fromaget C, el Aoumari A, Gros D. Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*. 1992;51(1):9-20.
69. Fu Y, Yan W, Mohun TJ, Evans SM. Vertebrate tinman homologues XNkx2-3 and XNkx2-5 are required for heart formation in a functionally redundant manner. *Development*. 1998;125(22):4439-4449.
70. Gajewski K, Fossett N, Molkentin JD, Schulz RA. The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in Drosophila. *Development*. 1999;126(24):5679-5688.
71. Gannon M, Bader D. Initiation of cardiac differentiation occurs in the absence of anterior endoderm. *Development*. 1995;121(8):2439-2450.
72. García-Martínez V, Schoenwolf GC. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol*. 1993;159(2):706-719.
73. Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC, Srivastava D. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*. 2003;424(6947):443-447.
74. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*. 1995;378(6555):390-394.
75. Gómez-Skarmeta JL, Modolell J. Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12(4):403-408.
76. Goodman, Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. McGraw Hill. 2007;pp166-169.
77. Goodwill KE, Sabatier C, Marks C, Raag R, Fitzpatrick PF, Stevens RC. Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases. *Nat Struct Biol*. 1997;4(7):578-585.
78. Gordon SL, Quinsey NS, Dunkley PR, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *J Neurochem*. 2008;106(4):1614-1623.
79. Gould J, Aramburo C, Capdevielle M, Scanes CG. Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sci*. 1995;56(8):587-594.
80. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Thompson RP. Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;185(4):363-378.
81. Grima B, Lamouroux A, Boni C, Julien JF, Javoy-Agid F, Mallet J. A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature*. 1987;326(6114):707-711.
82. Grow MW, Krieg PA. Tinman function is essential for vertebrate heart development: elimination of cardiac differentiation by dominant inhibitory mutants of the tinman-related genes, XNkx2-3 and XNkx2-5. *Dev Biol*. 1998;204(1):187-196.
83. Gruber PJ, Kubalak SW, Pexieder T, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(6):1332-1343.
84. Habets PE, Moorman AF, Clout DE, van Roon MA, Lingbeek M, van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM. Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5

- inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev.* 2002;16(10):1234-1246.
85. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 1951;88:49-92.
 86. Hatcher CJ, Diman NY, Kim MS, Pennisi D, Song Y, Goldstein MM, Mikawa T, Basson CT. A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics.* 2004;18(2):129-140.
 87. Hatcher CJ, Kim MS, Mah CS, Goldstein MM, Wong B, Mikawa T, Basson CT. TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis. *Dev Biol.* 2001;230(2):177-188.
 88. Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH, Krebs EG. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(6):2365-2369.
 89. Hernández-Sánchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, de Pablo F. Proinsulin in development: New roles for an ancient prohormone. *Diabetologia.* 2006;49(6):1142-1150.
 90. Hernández-Sánchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, Pollerberg GE, Martinez-Salas E, de Pablo F. Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level. *Embo J.* 2003;22(20):5582-5592.
 91. Hernández-Sánchez C, Rubio E, Serna J, de la Rosa EJ, de Pablo F. Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes.* 2002;51(3):770-777.
 92. Hernández-Sánchez C, Bártulos O, Valenciano AI, Mansilla A, de Pablo F. The regulated expression of chimeric tyrosine hydroxylase-insulin transcripts during early development. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(12):3455-3464.
 93. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 1997;36(2):149-162.
 94. Hillier, et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature.* 2004;432(7018):695-716.
 95. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet.* 2001;28(3):276-280.
 96. Holtzinger A, Evans T. Gata5 and Gata6 are functionally redundant in zebrafish for specification of cardiomyocytes. *Dev Biol.* 2007;312(2):613-622.
 97. Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, Bakker ML, Clout DE, Wakker V, Barnett P, Ravesloot JH, Moorman AF, Verheijck EE, Christoffels VM. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev.* 2007;21(9):1098-1112.
 98. Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res.* 2004;62(3):489-499.
 99. Horb ME, Thomsen GH. Tbx5 is essential for heart development. *Development.* 1999;126(8):1739-1751.
 100. Huang MH, Friend DS, Sunday ME, Singh K, Haley K, Austen KF, Kelly RA, Smith TW. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *The Journal of clinical investigation.* 1996;98(6):1298-1303.

101. Ignarro LJ, Shideman FE. Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968;159(1):38-48.
102. Iio A, Koide M, Hidaka K, Morisaki T. Expression pattern of novel chick T-box gene, Tbx20. *Dev Genes Evol.* 2001;211(11):559-562.
103. Ilagan R, Abu-Issa R, Brown D, Yang YP, Jiao K, Schwartz RJ, Klingensmith J, Meyers EN. Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development.* 2006;133(12):2435-2445.
104. Ilia M, Jeffery G. Retinal mitosis is regulated by dopa, a melanin precursor that may influence the time at which cells exit the cell cycle: analysis of patterns of cell production in pigmented and albino retinæ. *J Comp Neurol.* 1999;405(3):394-405.
105. Inagaki T, Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC. Regulative ability of the prospective cardiogenic and vasculogenic areas of the primitive streak during avian gastrulation. *Dev Dyn.* 1993;197(1):57-68.
106. Jacobson AG. Influences of ectoderm and endoderm on heart differentiation in the newt. *Dev Biol.* 1960;2:138-154.
107. Jeong H, Kim MS, Kim SW, Kim KS, Seol W. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by retinoic acid receptor. *J Neurochem.* 2006;98(2):386-394.
108. Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, Qing T, Sun X, Zhang P, Ding M, Li D, Deng H. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res.* 2007;17(4):333-344.
109. Jiang Y, Evans T. The Xenopus GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Dev Biol.* 1996;174(2):258-270.
110. Jiang Y, Tarzami S, Burch JB, Evans T. Common role for each of the cGATA-4/5/6 genes in the regulation of cardiac morphogenesis. *Dev Genet.* 1998;22(3):263-277.
111. Joh TH, Park DH, Reis DJ. Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: mechanism of enzyme activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(10):4744-4748.
112. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2005;25(19):4694-4705.
113. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell.* 2001;1(3):435-440.
114. Kirby ML, McKenzie JW, Weidman TA. Developing innervation of the chick heart: a histofluorescence and light microscopic study of sympathetic innervation. *Anat Rec.* 1980;196(3):333-340.
115. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *The Journal of clinical investigation.* 1996;98(1):216-224.
116. Kobayashi M, Matsuoka I, Kurihara K. Cholinergic differentiation of cultured sympathetic neurons induced by retinoic acid. Induction of choline acetyltransferase-mRNA and suppression of tyrosine hydroxylase-mRNA levels. *FEBS Lett.* 1994;337(3):259-264.

117. Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Hata T, Watanabe Y, Fujita K, Nagatsu T. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27235-27243.
118. Kolle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod*. 2003;68(5):1584-1589.
119. Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):8145-8149.
120. Kramer R, Bucay N, Kane DJ, Martin LE, Tarpley JE, Theill LE. Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4833-4838.
121. Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech Dev*. 2001;100(1):83-86.
122. Kuczenski RT, Mandell AJ. Allosteric activation of hypothalamic tyrosine hydroxylase by ions and sulphated mucopolysaccharides. *J Neurochem*. 1972;19(1):131-137.
123. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. 1997;11(8):1048-1060.
124. Ladd AN, Yatskievych TA, Antin PB. Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins. *Dev Biol*. 1998;204(2):407-419.
125. Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, Muskheli V, Murry CE. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol*. 2005;167(3):663-671.
126. Lambert GW, Thompson JM, Turner AG, Cox HS, Wilkinson D, Vaz M, Kalff V, Kelly MJ, Jennings GL, Esler MD. Cerebral noradrenaline spillover and its relation to muscle sympathetic nervous activity in healthy human subjects. *J Auton Nerv Syst*. 1997;64(1):57-64.
127. Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, Montoliu L. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *J Neurochem*. 2006;96(4):1201-1211.
128. Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem*. 1994;269(37):23177-23184.
129. Lawrence IE, Jr., Burden HW. Catecholamines and morphogenesis of the chick neural tube and notochord. *Am J Anat*. 1973;137(2):199-207.
130. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature*. 1995;378(6555):394-398.
131. Lee KH, Xu Q, Breitbart RE. A new tinman-related gene, nkx2.7, anticipates the expression of nkx2.5 and nkx2.3 in zebrafish heart and pharyngeal endoderm. *Dev Biol*. 1996;180(2):722-731.
132. Lefkowitz RJ. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol*. 2000;2(7):E133-136.

133. Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S. Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1965;148:1-8.
134. Lewis DA, Melchitzky DS, Haycock JW. Four isoforms of tyrosine hydroxylase are expressed in human brain. *Neuroscience.* 1993;54(2):477-492.
135. Lewis EJ, Harrington CA, Chikaraishi DM. Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(11):3550-3554.
136. Lewis EJ, Tank AW, Weiner N, Chikaraishi DM. Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase mRNA. *J Biol Chem.* 1983;258(23):14632-14637.
137. Li BL, Li XL, Duan ZJ, Lee O, Lin S, Ma ZM, Chang CC, Yang XY, Park JP, Mohandas TK, Noll W, Chan L, Chang TY. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) gene organization and evidence that the 4.3-kilobase ACAT-1 mRNA is produced from two different chromosomes. *J Biol Chem.* 1999;274(16):11060-11071.
138. Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol.* 2000;223(1):169-180.
139. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development.* 1993;119(3):969.
140. Lohr JL, Yost HJ. Vertebrate model systems in the study of early heart development: *Xenopus* and zebrafish. *Am J Med Genet.* 2000;97(4):248-257.
141. Lohse DL, Fitzpatrick PF. Identification of the intersubunit binding region in rat tyrosine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197(3):1543-1548.
142. López VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS. L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol.* 2008;6(9):e236.
143. López-Sánchez C, Climent V, Schoenwolf GC, Álvarez IS, García-Martínez V. Induction of cardiogenesis by Hensen's node and fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res.* 2002;309(2):237-249.
144. López-Sánchez C, García-Martínez V, Lawson A, Chapman SC, Schoenwolf GC. Rapid triple-labeling method combining in situ hybridization and double immunocytochemistry. *Dev Dyn.* 2004;230(2):309-315.
145. Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X. Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Dev Biol.* 1996;178(1):198-202.
146. Lough J, Sugi Y. Endoderm and heart development. *Dev Dyn.* 2000;217(4):327-342.
147. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* 1995;9(13):1654-1666.
148. Malhi GS, Berk M. Does dopamine dysfunction drive depression? *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 2007(433):116-124.
149. Manner J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec.* 2000;259(3):248-262.
150. Manner J. On rotation, torsion, lateralization, and handedness of the embryonic heart loop: new insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;278(1):481-492.

151. Mansilla A, López-Sánchez C, de la Rosa EJ, García-Martínez V, Martínez-Salas E, de Pablo F, Hernández-Sánchez C. Developmental regulation of a proinsulin messenger RNA generated by intron retention. *EMBO Rep.* 2005;6(12):1182-1187.
152. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* 2001;15(3):316-327.
153. Masters PS, Samuel CE. Detection of in vivo synthesis of polycistronic mRNAs of vesicular stomatitis virus. *Virology.* 1984;134(2):277-286.
154. Meier S, Solursh M. Mediation of growth hormone-enhanced expression of the cartilage phenotype in vitro by the availability of the essential amino acid valine. *Dev Biol.* 1973;30(2):290-306.
155. Meilhac SM, Kelly RG, Rocancourt D, Eloy-Trinquet S, Nicolas JF, Buckingham ME. A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development.* 2003;130(16):3877-3889.
156. Meyer D, Birchmeier C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature.* 1995;378(6555):386-390.
157. Miklowitz DJ, Johnson SL. The psychopathology and treatment of bipolar disorder. *Annu Rev Clin Psychol.* 2006;2:199-235.
158. Miyakawa N, Sato K, Momose-Sato Y. Optical detection of neural function in the chick visual pathway in the early stages of embryogenesis. *Eur J Neurosci.* 2004;20(5):1133-1149.
159. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol.* 2001;238(1):97-109.
160. Molkentin JD, Antos C, Mercer B, Taigen T, Miano JM, Olson EN. Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart. *Dev Biol.* 2000;217(2):301-309.
161. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 1997;11(8):1061-1072.
162. Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res.* 2007;100(3):354-362.
163. Montgomery MO, Litvin J, Gonzalez-Sanchez A, Bader D. Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. *Dev Biol.* 1994;164(1):63-71.
164. Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1223-1267.
165. Moorman AF, Christoffels VM, Anderson RH, van den Hoff MJ. The heart-forming fields: one or multiple? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007;362(1484):1257-1265.
166. Moorman AF, de Jong F, Denyn MM, Lamers WH. Development of the cardiac conduction system. *Circ Res.* 1998;82(6):629-644.
167. Morales AV, Serna J, Alarcon C, de la Rosa EJ, de Pablo F. Role of prepancreatic (pro)insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. *Endocrinology.* 1997;138(9):3967-3975.

168. Muñoz-Chapuli R, Macías D, González-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Pérez-Pomares JM. [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development.]. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55(10):1070-1082.
169. Murray GK, Corlett PR, Clark L, Pessiglione M, Blackwell AD, Honey G, Jones PB, Bullmore ET, Robbins TW, Fletcher PC. Substantia nigra/ventral tegmental reward prediction error disruption in psychosis. *Mol Psychiatry*. 2008;13(3):239, 267-276.
170. Nagatsu T. Biopterin cofactor and regulation of monoamine-synthesizing mono-oxygenases. *Trends. Pharmacol. Sci*. 1981;40:276-279.
171. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine Hydroxylase. the Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem*. 1964;239:2910-2917.
172. Nagatsu T, Yamaguchi T, Rahman MK, Trocewicz J, Oka K, Hirata Y, Nagatsu I, Narabayashi H, Kondo T, Iizuka R. Catecholamine-related enzymes and the biopterin cofactor in Parkinson's disease and related extrapyramidal diseases. *Adv Neurol*. 1984;40:467-473.
173. Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(52):19812-19817.
174. Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, Tian X, Kaufman DS, Thomson JA, Zanjani ED. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood*. 2006;107(5):2180-2183.
175. Nascone N, Mercola M. An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Development*. 1995;121(2):515-523.
176. Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development*. 2001;128(7):1019-1031.
177. Nieto MA, Patel K, Wilkinson DG. In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol*. 1996;51:219-235.
178. Nieuwkoop PD, Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis*. Amsterdam: North Holland. 1956.
179. Nilsen TW. Trans-splicing in nematodes. *Exp Parasitol*. 1989;69(4):413-416.
180. Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG. Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci*. 2003;23(7):2840-2850.
181. Pachl CA, Young ET. Detection of polycistronic and overlapping bacteriophage T7 late transcripts by in vitro translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(2):312-316.
182. Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M. Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*. 2002;418(6898):636-641.
183. Papaioannou VE. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol*. 2001;207:1-70.
184. Parlow MH, Bolender DL, Kokan-Moore NP, Lough J. Localization of bFGF-like proteins as punctate inclusions in the preseptation myocardium of the chicken embryo. *Dev Biol*. 1991;146(1):139-147.
185. Patel NH, Martin-Blanco E, Coleman KG, Poole SJ, Ellis MC, Kornberg TB, Goodman CS. Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell*. 1989;58(5):955-968.

186. Pérez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Muñoz-Chapuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol*. 2002;46(8):1005-1013.
187. Pérez-Villamil B, de la Rosa EJ, Morales AV, de Pablo F. Developmentally regulated expression of the preproinsulin gene in the chicken embryo during gastrulation and neurulation. *Endocrinology*. 1994;135(6):2342-2350.
188. Perler F, Efstratiadis A, Lomedico P, Gilbert W, Kolodner R, Dodgson J. The evolution of genes: the chicken preproinsulin gene. *Cell*. 1980;20(2):555-566.
189. Plageman TF, Jr., Yutzey KE. T-box genes and heart development: putting the "T" in heart. *Dev Dyn*. 2005;232(1):11-20.
190. Popolo M, McCarthy DM, Bhide PG. Influence of dopamine on precursor cell proliferation and differentiation in the embryonic mouse telencephalon. *Dev Neurosci*. 2004;26(2-4):229-244.
191. Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, Watanabe Y, Zaffran S, Bajolle F, Biben C, McBride JJ, Robertson BR, Chaulet H, Stennard FA, Wise N, Schaft D, Wolstein O, Furtado MB, Shiratori H, Chien KR, Hamada H, Black BL, Saga Y, Robertson EJ, Buckingham ME, Harvey RP. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*. 2007;128(5):947-959.
192. Proux V, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Laugier D, Calothy G, Marx M. Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells. *J Biol Chem*. 1996;271(48):30790-30797.
193. Reiter JF, Alexander J, Rodaway A, Yelon D, Patient R, Holder N, Stainier DY. Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev*. 1999;13(22):2983-2995.
194. Rodríguez-Martín E, Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Handler A, Mena MA. L-DOPA and glia-conditioned medium have additive effects on tyrosine hydroxylase expression in human catecholamine-rich neuroblastoma NB69 cells. *J Neurochem*. 2001;78(3):535-545.
195. Rosenquist GC. Location and movements of cardiogenic cells in the chick embryo: the heart-forming portion of the primitive streak. *Dev Biol*. 1970;22(3):461-475.
196. Ryckebusch L, Wang Z, Bertrand N, Lin SC, Chi X, Schwartz R, Zaffran S, Niederreither K. Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2913-2918.
197. Sanders EJ, Harvey S. Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor. *Anat Embryol (Berl)*. 2004;209(1):1-9.
198. Sarasa M, Climent S. Effects of catecholamines on early development of the chick embryo: relationship to effects of calcium and cAMP. *J Exp Zool*. 1987;241(2):181-190.
199. Sarasa M, Climent S. Cardiac differentiation induced by dopamine in undifferentiated cells of early chick embryo. *Dev Biol*. 1991;148(1):243-248.
200. Sato M, Yost HJ. Cardiac neural crest contributes to cardiomyogenesis in zebrafish. *Dev Biol*. 2003;257(1):127-139.
201. Schneider VA, Mercola M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev*. 2001;15(3):304-315.
202. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*. 1998;281(5373):108-111.

203. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 1997;11(4):451-462.
204. Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB. Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development.* 1995;121(12):4203-4214.
205. Schussler N, Boularand S, Li JY, Peillon F, Mallet J, Biguet NF. Multiple tyrosine hydroxylase transcripts and immunoreactive forms in the rat: differential expression in the anterior pituitary and adrenal gland. *J Neurosci Res.* 1995;42(6):846-854.
206. Serbedzija GN, Chen JN, Fishman MC. Regulation in the heart field of zebrafish. *Development.* 1998;125(6):1095-1101.
207. Shiojima I, Komuro I, Oka T, Hiroi Y, Mizuno T, Takimoto E, Monzen K, Aikawa R, Akazawa H, Yamazaki T, Kudoh S, Yazaki Y. Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *J Biol Chem.* 1999;274(12):8231-8239.
208. Snarr BS, Kern CB, Wessels A. Origin and fate of cardiac mesenchyme. *Dev Dyn.* 2008;237(10):2804-2819.
209. Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell.* 2006;126(6):1037-1048.
210. Stalsberg H, DeHaan RL. The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol.* 1969;19(2):128-159.
211. Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(1):23-28.
212. Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1246-1251.
213. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev.* 1994;8(9):1007-1018.
214. Sullivan PM, Petrusz P, Szpirer C, Joseph DR. Alternative processing of androgen-binding protein RNA transcripts in fetal rat liver. Identification of a transcript formed by trans splicing. *J Biol Chem.* 1991;266(1):143-154.
215. Tam PP, Parameswaran M, Kinder SJ, Weinberger RP. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development.* 1997;124(9):1631-1642.
216. Tanaka M, Kasahara H, Bartunkova S, Schinke M, Komuro I, Inagaki H, Lee Y, Lyons GE, Izumo S. Vertebrate homologs of tinman and bagpipe: roles of the homeobox genes in cardiovascular development. *Dev Genet.* 1998;22(3):239-249.
217. Tanaka M, Schinke M, Liao HS, Yamasaki N, Izumo S. Nkx2.5 and Nkx2.6, homologs of Drosophila tinman, are required for development of the pharynx. *Mol Cell Biol.* 2001;21(13):4391-4398.
218. Tanaka M, Tickle C. Tbx18 and boundary formation in chick somite and wing development. *Dev Biol.* 2004;268(2):470-480.
219. Tanaka M, Yamasaki N, Izumo S. Phenotypic characterization of the murine Nkx2.6 homeobox gene by gene targeting. *Mol Cell Biol.* 2000;20(8):2874-2879.
220. Targoff KL, Schell T, Yelon D. Nkx genes regulate heart tube extension and exert differential effects on ventricular and atrial cell number. *Dev Biol.* 2008.

221. Thomas SA, Matsumoto AM, Palmiter RD. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature*. 1995;374(6523):643-646.
222. Tonissen KF, Drysdale TA, Lints TJ, Harvey RP, Krieg PA. XNkx-2.5, a *Xenopus* gene related to Nkx-2.5 and tinman: evidence for a conserved role in cardiac development. *Dev Biol*. 1994;162(1):325-328.
223. Tzschentke TM, Schmidt WJ. Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol*. 2000;14(2):131-142.
224. Valenciano AI, Corrochano S, de Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ. Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J Neurochem*. 2006;99(2):524-536.
225. Vassall-Adams PR. The development of the atrioventricular bundle and its branches in the avian heart. *J Anat*. 1982;134(Pt 1):169-183.
226. Viragh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec*. 1981;201(1):157-168.
227. Viragh S, Szabo E, Challice CE. Formation of the primitive myo- and endocardial tubes in the chicken embryo. *J Mol Cell Cardiol*. 1989;21(2):123-137.
228. Vrana KE, Walker SJ, Rucker P, Liu X. A carboxyl terminal leucine zipper is required for tyrosine hydroxylase tetramer formation. *J Neurochem*. 1994;63(6):2014-2020.
229. Vyas S, Faucon Biguet N, Mallet J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase gene by protein kinase C. *Embo J*. 1990;9(11):3707-3712.
230. Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232(7):852-865.
231. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. 2001;128(16):3179-3188.
232. Warkman AS, Krieg PA. *Xenopus* as a model system for vertebrate heart development. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(1):46-53.
233. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation*. 1991;48(3):173-182.
234. Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, Clapham DE, Lien CL, Schultheiss TM, Orkin SH. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*. 2006;127(6):1137-1150.
235. Xu H, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, Baldini A. Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development*. 2004;131(13):3217-3227.
236. Yamada M, Revelli JP, Eichele G, Barron M, Schwartz RJ. Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of Tbx2. *Dev Biol*. 2000;228(1):95-105.
237. Yamagishi H, Maeda J, Hu T, McAnally J, Conway SJ, Kume T, Meyers EN, Yamagishi C, Srivastava D. Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev*. 2003;17(2):269-281.

238. Yamauchi T, Nakata H, Fujisawa H. A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca^{2+} -, calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 1981;256(11):5404-5409.
239. Yang BY, Greene M, Chen TT. Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol Reprod Dev*. 1999;53(2):127-134.
240. Yang X, Dormann D, Munsterberg AE, Weijer CJ. Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell*. 2002;3(3):425-437.
241. Yatskievych TA, Ladd AN, Antin PB. Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast: the role of the hypoblast and activin. *Development*. 1997;124(13):2561-2570.
242. Zaffran S, Frasch M. Early signals in cardiac development. *Circ Res*. 2002;91(6):457-469.
243. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res*. 2004;95(3):261-268.
244. Zhao R, Watt AJ, Battle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol*. 2008;317(2):614-619.
245. Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature*. 1995;374(6523):640-643.
246. Zhu Y, Gramolini AO, Walsh MA, Zhou YQ, Slorach C, Friedberg MK, Takeuchi JK, Sun H, Henkelman RM, Backx PH, Redington AN, MacLennan DH, Bruneau BG. Tbx5-dependent pathway regulating diastolic function in congenital heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(14):5519-5524.

